

Die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Entwicklung von „bystander“-Effekten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches

Bio- und Geowissenschaften,

Landschaftsarchitektur

an der

Universität-Duisburg-Essen

vorgelegt von

Rabea Tischka

aus Castrop-Rauxel

Februar 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für medizinische Strahlenbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Helmut Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2006

**Es ist schwieriger eine vorgefasste Meinung
zu zertrümmern, als ein Atom.**

(Albert Einstein)

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 „Bystander“-Effekte: Definition und allgemeine Auswirkungen	1
1.2 „Bystander“-Effekte: frühe Beobachtungen und generelle Klassifizierung	2
1.3 „Bystander“-Effekte durch Mediumtransfer	5
1.4 „Bystander“-Effekte durch partielle Bestrahlung	7
1.5 Die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Induktion von „bystander“-Effekten	11
1.6 Die biologische Bedeutung der „bystander“-Effekte	14
1.7 Übersicht über den Zellzyklus	16
1.8 DNA-Schadens-Kontrollpunkte	17
1.9 Mikronuklei	19
1.10 Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Geräteliste	22
2.2 Plastikgefäße und Einwegmaterial	22
2.3 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
2.4 Protein-Molekulargewichtsstandards	24
2.5 Puffer und Lösungen	25
2.6 Antikörper	26
2.6.1 Primäre Antikörper	26
2.6.2 Sekundäre Antikörper	27
2.7 Zellbiologische Methoden	27
2.7.1 Medien für die Zellkultur	27
2.7.2 Zelllinien	28
2.7.3 Kultivierungsbedingungen	30
2.7.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.7.5 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Z2 Coulter Particle Counter und Size Analyser	31

2.8	Proteinchemische Methoden	32
2.8.1	Herstellung von Gesamtproteinlysaten aus Zellen	32
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen	33
2.8.4	Western Blot	34
2.8.5	Immundetektion von Proteinen	34
2.9	Bestrahlung der Zellkulturen	35
2.9.1	Bestrahlung mit Photonen	35
2.9.1.1	Röntgengerät	35
2.9.1.2	Dosimetrie der Bestrahlung mit Photonen	36
2.9.2	Bestrahlung mit Neutronen	36
2.9.2.1	Zyklotronanlage	36
2.9.2.2	Versuchsanordnung	36
2.9.2.3	Dosimetrische Untersuchungen zur Bestrahlung mit Neutronen	38
2.10	Durchflusszytometrie	40
2.11	Farbstoff-Transfer-Assay und FACS-Analyse zur quantitativen Ermittlung der Zellkopplung	40
2.12	Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™	43
2.13	Untersuchung von „bystander“-Effekten	44
2.14	Untersuchung des Zellzyklus	45
2.15	Untersuchung von „bystander“-Effekten mit Hilfe des „transwell insert coculture system“	46
2.16	Nachweis von Mikronuklei in binukleären b-End Zellen	47
2.16.1	Cytochalasin B-Zugabe	47
2.16.2	KCl-Behandlung	47
2.16.3	Fixierung der b-End Zellen	47
2.16.4	Färbung und Auswertung der Mikronuklei beim Mikronukleustest	48
2.17	Software	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Experimente zu den Eigenschaften der Farbstoffe	49
3.1.1	Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI	49
3.1.1.1	Der Fluoreszenzfarbstoff DiI	49

3.1.1.2	Mechanismus der DiI-Färbung	49
3.1.1.3	Färbung: adhärent oder in Suspension	52
3.1.1.4	Kinetik der DiI Färbung	53
3.1.1.5	Toxizität der DiI Färbung	54
3.1.1.6	Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf ungefärbte Zellen	56
3.1.1.7	Alternative Farbstoffe zu DiI: Färbung mit verschiedenen DiI Derivaten	60
3.1.1.8	Einfluss von Bestrahlung auf die DiI Färbung	62
3.1.2	Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM	64
3.1.2.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM	64
3.1.2.2	Mechanismus der Calcein Färbung	64
3.1.2.3	Färbung: adhärent oder in Suspension?	66
3.1.2.4	Kinetik der Calcein Färbung	67
3.1.2.5	Toxizität der Calcein Färbung	69
3.2	Interzelluläre Kommunikation	71
3.2.1	Methode zum Nachweis der interzellulären Kommunikation über gap junctions	71
3.2.2	Zeitabhängigkeit der Kopplung in b-End Zellen	74
3.2.3	Optimierung der Kopplung in b-End Zellen	75
3.2.4	Optimierung der Kopplung in Abhängigkeit von der Zellzahl	76
3.2.5	Einfluss der Bestrahlung auf die Kopplung in b-End Zellen	77
3.3	Untersuchung der p53 Aktivierung nach Bestrahlung	78
3.3.1	p53 nach Röntgenbestrahlung in b-End Zellen	78
3.3.2	Untersuchung der p53 Phosphorylierung nach Bestrahlung mit Neutronen	79
3.3.3	Analyse des G ₂ -Block nach Bestrahlung	80
3.3.4	G ₂ -Block nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in b-End Zellen	80
3.3.5	G ₂ -Block nach Bestrahlung mit Neutronen	82
3.4	„Bystander“-Effekte	85
3.4.1	Neue Verfahrensweisen zur Untersuchung von „bystander“-Effekten	85
3.5	Untersuchung von „bystander“-Effekten in verschiedenen Zelllinien	86
3.5.1	Die Maus-Endothelzelllinie b-End	87
3.5.2	Die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3	97
3.5.3	Die Haut-Fibroblastenzelllinie AG 1522	101

3.5.4	Die Glioblastoma Zelllinie T98G	102
3.5.5	Die Ratten-Embryofibroblasten A1-5	105
3.5.6	Die menschliche Endothelzelllinie EA. Hy 926	109
3.5.7	Die humane Lungencarcinoma Zelllinie A549	112
3.6	Untersuchung von „bystander“-Effekten mit Hilfe des „transwell insert coculture system“	114
3.6.1	Analyse von Mikronuklei in binukleären b-End Zellen ohne Co-Kultur	114
3.6.2	Analyse von Mikronuklei in unbehandelten b-End Zellen nach Co-Kultur mit bestrahlten b-End Zellen	116
4	Diskussion	118
4.1	Untersuchung der Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM und DiI	119
4.2	Nachweis der interzellulären Kommunikation über gap junctions mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein AM und DiI	120
4.3	Untersuchung von „bystander“-Effekten in nicht bestrahlten Zellen mit Hilfe der Co-Kulturtechnik	121
4.3.1	Co-Kultivierung von bestrahlten und unbestrahlten Zellen und anschließende Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™	121
4.3.2	Untersuchung der Endpunkte p53 und G ₂ -Arrest in bestrahlten und unbestrahlten „bystander“ Zellen nach erfolgter Co-Kultur	126
4.4	Vor- und Nachteile der neuen Co-Kulturtechnik	130
4.5	Die Untersuchung von „bystander“-Effekten mit Hilfe des „transwell insert coculture system“	134
4.5.1	Ergebnisse der Analyse von Mikronuklei in „bystander“ b-End Zellen nach erfolgter Co-Kultur mit bestrahlten b-End Zellen	135
5	Zusammenfassung	137
6	Literaturverzeichnis	139
7	Danksagung	149
8	Lebenslauf	150
9	Erklärung	151

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
Cx	Connexin
D-MEM	<i>Dulbeccos modified eagles medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxyzyklin
FKS	fötales Kälberserum
G-Phasen (0/1/2)	<i>Gap</i> -Phasen
FACS	fluoreszenzaktivierte Durchflußzytometrie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
kDa	Kilodalton
LET	linearer Energietransfer
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SCE	<i>Sister chromatid exchange</i> , Schwesterchromatidenaustausch
Tet	Tetrazyklin
TRIS	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 „Bystander-Effekte“: Definition und allgemeine Auswirkungen

Nach Einwirkung ionisierender Strahlung treten im wesentlichen vier schädigende Effekte auf: Zelltod, Fehlbildungen, Tumoren und Erbkrankheiten. Eine weit verbreitete Annahme in der Radiobiologie ist, dass diese Effekte immer eine direkte Konsequenz von unreparierten oder falsch reparierten DNA-Schäden in direkt getroffenen Zellen sind (Little et al. 2002). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Phänomenen beobachtet, die diese Annahme in Frage stellen. Zahlreiche Befunde sprechen nun dafür, dass viele der Effekte die nach direkter Bestrahlung von Zellen auftreten, ebenso in Zellen zu finden sind, welche nicht direkter Bestrahlung ausgesetzt waren, aber sich in unmittelbarer Nachbarschaft von bestrahlten Zellen befanden (Goldberg und Lehnert 2002). Diese Situation wird durch den Ausdruck „strahleninduzierter bystander-Effekt“ beschrieben. Gemäß dieser Definition sind „bystander“ Zellen nicht direkt von ionisierenden Teilchen oder Wellen getroffen worden, zeigen aber typische Effekte von bestrahlten Zellen. Zu diesen Effekten zählen reduziertes Zellwachstum, Zelltod, Chromosomen-Aberrationen, Mutationen, genomische Instabilität, sowie eine Erhöhung der intrazellulären ROS (reactive oxygen species) (Mothersill und Seymour 2004).

Diese Beobachtungen führen zu einer neuen Sichtweise von zellulären Antworten auf ionisierende Strahlung. Es stellt sich die Frage, ob die fundamentalen Annahmen, die den Richtlinien im Strahlenschutz zugrunde liegen, noch Gültigkeit besitzen. Die gültigen Strahlenschutzbestimmungen beruhen im wesentlichen auf den epidemiologischen Daten der japanischen Atombombenüberlebenden. Hierbei werden die bei hohen Dosen und Dosisleistungen beobachteten Krebsinzidenzen auf der Basis einer linearen oder linear-quadratischen Dosiswirkungsbeziehung zu niedrigen Dosen (mSv-Bereich) zurück-extrapoliert. Diese Richtlinien berücksichtigen also nicht mögliche „bystander“-Effekte im niedrigen Dosisbereich und könnten dazu führen, dass das Risiko von geplanten oder durch einen Unfall verursachten Expositionen durch ionisierende Strahlung im niedrigen Dosisbereich unterschätzt wird.

Bislang ging man im Umgang mit Strahlung davon aus, dass Schäden nur im Bereich der Bestrahlung zu finden sind und nicht im umliegenden Gewebe. Wenn „bystander“-Effekte einen signifikanten Beitrag zur allgemeinen Reaktion liefern, dann muss dies sowohl in normalen Geweben als auch im Tumor untersucht werden. Denn der relative Beitrag der „bystander“-Effekte zur gesamten Reaktion auf ionisierende Strahlung

und das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen sind die Bedingungen für exakte Empfehlungen im Strahlenschutz und für vernünftige Vorhersagen in der Strahlentherapie.

Seit Jahren beschäftigt sich das Institut für Medizinische Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Essen mit dem elementaren Wissen, welches für den Strahlenschutz von Bedeutung ist. Mit Unterstützung von EURATOM, einer Abteilung der EU-Kommission, werden innerhalb des Rahmenprogramms 5 (FP5) „bystander“-Effekte untersucht. Das längerfristige Ziel des Projektes ist es, einen Beitrag zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der „bystander“-Antwort zu liefern. Dieses Verständnis kann dann angewendet werden, um die schädigenden Effekte zufälliger oder geplanter Expositionen durch ionisierende Strahlung zu reduzieren.

Die vorliegende Arbeit ist aus diesem Projekt hervorgegangen und versucht ein mechanistisches Verständnis der Prozesse zu geben, die zur Entwicklung der „bystander“-Antwort führen. Bevor die zugrunde liegenden Hypothesen dieser Arbeit und die durchgeführten Experimente beschrieben werden, wird dem Leser ein Überblick über dieses Forschungsfeld gegeben.

1.2 „Bystander“-Effekte: frühe Beobachtungen und generelle

Klassifizierung

Seit mehr als 60 Jahren findet man Effekte, die typisch sind für direkt bestrahlte Zellen, auch in nicht direkt bestrahlten Zellen. Dale berichtete schon zu dieser Zeit (Dale 1940, 1942, 1943), dass die Inaktivierung biologischen Materials durch Ionisation innerhalb des Moleküls und über die Ionisierung des umgebenden Mediums erfolgen kann. Dale hat beim Bestrahlen von Carboxypeptidase mit Röntgenstrahlung festgestellt, dass bei einer Dosis von 50 r über 30% des Enzyms inaktiviert werden, wohingegen eine Dosis von 100.000 r benötigt wird, um denselben prozentualen Effekt in einer 345 fach konzentrierteren Lösung von Carboxypeptidase zu erzielen. Eine verdünnte Lösung kann durch kleine Dosen komplett zerstört werden (radiosensitiv) und eine konzentriertere Lösung, die denselben Dosen ausgesetzt wird, bleibt nahezu unbeeinflusst (radioresistent). Dieser Effekt, der analog auch für andere Enzyme gilt, wird als „Verdünnungseffekt“ bezeichnet. Der Verdünnungseffekt basiert auf folgendem Mechanismus: die Strahlung reagiert zunächst mit dem Wasser unter Bildung eines Zwischenproduktes. Dieses Zwischenprodukt reagiert dann mit der gelösten Substanz. Daraus folgt, dass direkte Bestrahlung für die Entwicklung von Strahleneffekten nicht zwingend nötig ist, und es legt

den Ablauf einer „bystander“-ähnlichen Antwort nahe. Kotval und Gray zeigten 1947 (Hall 2003), dass α -Partikel nicht direkt ein Chromatid treffen müssen, um mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zu Chromatid- und Isochromatid-Brüchen oder Chromatid-Austauschen zu führen. Obwohl diese Beobachtungen schwer zu interpretieren sind, nimmt man sie rückblickend als Beweis für die Existenz von „bystander“-Antworten.

1954 kamen erstmals Hinweise dafür auf, dass Bestrahlung mit ionisierender Strahlung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu Effekten in nicht bestrahlten Säugerzellen führt. Es wurden Veränderungen im Knochenmark von Kindern beobachtet, deren Milz bestrahlt wurde zur Behandlung chronischer granulozytischer Leukämie (Parsons 1954). Weitere starke Hinweise auf die Existenz von „bystander“-Effekten lieferte die Entwicklung von Brusttumoren in Ratten, die mit Blutplasma oder Ultrafiltraten von Blut behandelt wurden, welches von mit niedrig LET bestrahlten Ratten oder Schafen stammte (Souto 1962). Ebenso zeigten Lymphocyten, die für kurze Zeit mit Plasma kultiviert wurden, das von mit Röntgenstrahlen bestrahlten Patienten stammte, Chromosomen-Schäden (Hollowell und Littlefield 1968). Diese Experimente lieferten jedoch keine Hinweise auf die betreffenden Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen.

Für eine genaue Überprüfung und weiterführende Untersuchung der molekularen Prozesse war es von größter Wichtigkeit, ein System zu entwickeln, welches experimentelle Manipulationen zulässt. Dieses Modellsystem kann man allgemein in zwei Kategorien einteilen, je nachdem welcher experimentelle Ansatz zugrunde liegt. Die erste Kategorie umfasst die Mediumtransfer-Experimente. Hierbei wird Medium von bestrahlten Zellen auf nicht bestrahlte Zellen übertragen, was zu einem biologischen Effekt in den nicht bestrahlten Zellen führt. In diesem Fall sind die „bystander“-Zellen nicht in physikalischem Kontakt mit den bestrahlten Zellen und die beobachteten Effekte werden vermutlich durch lösliche Moleküle vermittelt, die von den bestrahlten Zellen produziert und ausgeschieden werden.

Zur zweiten Kategorie gehören die Experimente mit Monolayer Zellkulturen, die mit α -Partikeln entweder aus einer externen Quelle bestrahlt wurden (Nagasawa und Little 1992, de Toledo et al. 1998) oder mit einem Microbeam, so dass nur ein kleiner Teil der Zellen in der Population durch ein α -Teilchen getroffen wurde (Hei et al. 1997, Prise et al. 1998). Im letzteren Fall werden die „bystander“-Effekte in Zellen untersucht, die nicht direkt bestrahlt wurden. Da diese Experimente entweder mit sehr dünn besiedelten Zellkulturen oder konfluenten Zellkulturen durchgeführt werden, kann der Effekt der interzellulären Kommunikation in der Entwicklung von „bystander“-Effekten untersucht

werden. Die Möglichkeit von Zellen über gap junctions zu kommunizieren, scheint eine signifikante Rolle in der Entwicklung von bystander Antworten zu spielen und ist ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit. Abbildung 1 fasst beide Wege zusammen.

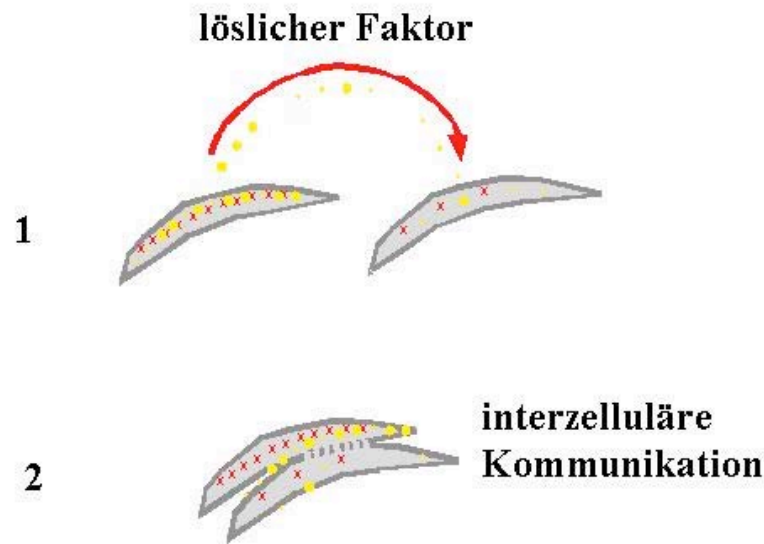


Abb. 1: 1 bestrahlte Zellen können lösliche Signalproteine produzieren, z.B. Cytokine und Wachstumsfaktoren, diese können über die nötigen Oberflächenrezeptoren wiederum eine Antwort in den unbestrahlten Zellen induzieren
2 bestrahlte Zellen können eine Antwort in Nachbarzellen induzieren durch die Übertragung von Signalen in unbestrahlte Zellen über gap junctions

Der Wunsch nach gezielter Bestrahlung von einzelnen Zellen und die Notwendigkeit einer eindeutigen Trennung und Identifizierung von bestrahlten und unbestrahlten Zellen führte zu einer hochentwickelten Microbeam Anlage, die vielversprechend ist für eine umfangreiche Untersuchung von „bystander“-Effekten (siehe Kap. 1.4). Vergleicht man die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Versuchsanordnungen (Abb. 1) erzielt wurden, sollte man berücksichtigen, dass es nicht sicher ist, dass beide Versuchsanordnungen dasselbe Phänomen beschreiben und es durchaus sein könnte, dass unterschiedliche Mechanismen an der Entwicklung von „bystander“-Effekten beteiligt sind (Hall 2003).

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zusammengefasst, die bis heute vorliegen. Zuvor sollte jedoch erwähnt werden, dass die „bystander“ Terminologie umfassend im Bereich der Gentherapie und Toxikologie gebraucht wird (Djordjevic 2000).

Das Genprodukt der transfizierten DNA bzw. die Metabolite, die durch die Aktivität von exprimierten Genen erzeugt wurden, können durch gap junctions von den transfizierten Zellen auf die Nachbarzellen übertragen werden und Reaktionen in Abwesenheit des wirksamen Agens erzeugen (Moolten 1986). Obwohl das Prinzip in beiden Phänomenen ähnlich ist, sollte hervorgehoben werden, dass im Fall der Bestrahlung die mechanistische Basis für die Entwicklung von „bystander“-Effekten nicht so eindeutig ist wie im Fall der Gentherapie und Toxikologie (Goldberg und Lehnert 2002).

1.3 „Bystander“-Effekte durch Mediumtransfer

Eine Reihe von Experimenten deutet daraufhin, dass bestrahlte Individuen einen Faktor ins Blutplasma frei setzen, der Chromosomen-Schäden in unbestrahlten Empfängern induziert (Goh und Sumner 1968, Hollowell und Littlefield 1968, Scott 1969). Diese Beobachtungen können erweitert werden mit *in vitro* Experimenten, die den Transfer von Medium von bestrahlten auf unbestrahlte Zellen beinhalten und häufig eine signifikante Reduktion der „Plating Efficiency“ sowohl in normalen als auch in Tumorzellen aufweisen, unabhängig davon, ob diese bestrahlt wurden oder nicht (Mothersill und Seymour 1997a). In einem umfassenden *in vitro* und *in vivo* Experiment konnten diese Autoren zeigen, dass die Exposition von Zellkulturen oder Gewebe mit Gammastrahlen mit Dosen kleiner als 1 cGy zur Freisetzung eines Faktors führt, der die „Cloning Efficiency“ von unbestrahlten Zellen durch Apoptose beeinflusst (Mothersill und Seymour 1998a). Diese Beobachtung steht in Verbindung mit Veränderungen in der Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran und der Induktion von ROS (Lyng et al. 2001). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen in der Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran von Änderungen in der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration begleitet werden (Lyng et al. 2002). Daraus folgt die Annahme, dass bestrahlte Zellen ein Molekül abgeben, das fähig ist, zumindest einige Subpopulationen von nicht bestrahlten Zellen zu töten. Obwohl sich in den letzten drei Jahrzehnten die Beweise für einen solchen Faktor gehäuft haben, ist seine exakte Natur schwer fassbar trotz der Tatsache, dass diese Faktoren für viele Monate oder Jahre nach Bestrahlung produziert werden (Azzam et al. 2003).

Eine weitere Schwierigkeit im Bezug auf die Mediumtransfer-Experimente besteht darin, dass die gemessenen Effekte nicht immer reproduzierbar sind. So kommt es vor, dass manche Laboratorien einen „bystander“-Effekt für „sister chromatid exchanges“ in klassischen Mediumtransfer-Experimenten finden (Narayanan et al. 1997a, Narayanan et

al. 1997b). Dagegen ermittelten andere Forschergruppen unter ähnlichen Bedingungen nur kleine oder gar keine Hinweise auf einen solchen „bystander“-Effekt (Belyakov et al. 2001).

Auch Lyng und Sawant beschreiben nach Inkubation in bestrahltem Medium eine Reduktion der „Cloning Efficiency“ in den Empfängerzellen (Lyng et al. 2002, Sawant et al. 2002), wogegen Iyer und Lehnert eine Erhöhung in der „Plating Efficiency“ finden (Iyer und Lehnert 2002). Trotz dieser Widersprüche werden Cytokine und ROS in Verbindung gebracht mit den biologischen Effekten, die in den „bystander“ Zellen sowohl nach Bestrahlung mit niedrig als auch mit hoch LET Strahlung auftreten (Narayanan et al. 1997a). Eine allgemein gültige Ursache-Wirkungs-Beziehung muss jedoch erst noch nachgewiesen werden (Azzam et al. 2003).

Ein Grund für die Variationen in der „bystander“ Antwort nach Mediumtransfer könnte sein, dass nicht alle Zellen in der Lage sind, diese toxischen Faktoren zu produzieren bzw. nicht alle Zellen besitzen die Fähigkeit, auf einen solchen Faktor zu reagieren (Mothersill und Seymour 1997b). Ebenso ist es möglich, dass dieser besondere Faktor, welcher die „bystander“ Antwort auslöst, nur dann auftritt, wenn ein bestimmter Endpunkt untersucht wird. In diesem Zusammenhang berichten Zhou *et al.* (2001), dass, obwohl die bestrahlten Zellen einen cytotoxischen Faktor freisetzen, der die nicht bestrahlten Zellen tötet, keine Induktion von Mutationen hervorgerufen wird. Dazu kommt, dass viele Zellen benötigt werden, um einen entsprechenden Effekt über Mediumtransfer-Experimente zu erzielen (Mothersill und Seymour 1997b). Aus den Mediumtransfer-Experimenten geht jedoch klar hervor, dass der Faktor, der die „bystander“ Antwort auslöst, in einer aktiven Form von den Zellen ausgeschieden werden kann und dass interzelluläre Kommunikation über gap junctions für die Entwicklung des Faktors nicht nötig ist (Mothersill und Seymour 1997b, Mothersill und Seymour 1998b, Yang et al. 2005).

Seit kurzem wird eine neue Methode verwendet, mit der gezeigt werden konnte, dass Exposition von Zellen mit niedrig LET Strahlung über das Medium vermittelte „bystander“-Effekte auslöst (Yang et al. 2005). Bei dieser Methode sind zwei verschiedene Zellschichten durch eine permeable Membran voneinander getrennt. Diese Membran weist Poren mit einem Durchmesser von 1 μm auf und erlaubt sowohl den Austausch von Molekülen als auch die physikalische Trennung der Zellen, so dass es möglich wird, nur eine der beiden Zellpopulationen zu bestrahlen. Dieser Versucheinsatz kommt in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls zum Einsatz.

Eine außergewöhnliche Form von Medium vermittelten „bystander“-Effekten wurde von Nagar et al. (2003) beschrieben. In diesen Experimenten wurde bestrahltes Medium von einer klonalen Zellpopulation geerntet. Diese klonalen Zellen leiten sich von genomisch instabilen einzelnen Zellen ab, die eine Bestrahlung überlebten. Dieses bestrahlte Medium ist für normale Zellen sehr toxisch. Der Effekt geht verloren, wenn man das Medium erhitzt oder einfriert, bei Verdünnung mit frischen Medium bleibt der Effekt jedoch erhalten. Dieses Zelltod-induzierende-Phänomen (DIE = death inducing effect) wird wahrscheinlich über die extrazelluläre Sekretion von DIE Faktoren ausgelöst, speziell von chromosomal instabilen Chromosomen. Der DIE Faktor wird innerhalb von 8h ausgeschieden und führt in 24h zum Zelltod.

Obwohl bei den oben beschriebenen „bystander“-Effekten meist negative Konsequenzen für die „bystander“ Zellen beschrieben werden, gibt es durchaus auch positive Effekte. Es konnte gezeigt werden, dass Medium, welches von mit α -Partikeln bestrahlten Zellen stammt, die Zellproliferation in nicht bestrahlten Zellen fördert. Die promotische Antwort ist mit einer Zunahme an $TGF_{\beta 1}$ verbunden, der an der Zunahme von interzellulärem ROS in „bystander“ Zellen beteiligt ist (Iyer und Lehnert 2000). Ähnliche Experimente zeigten eine Zunahme von AP Endonuklease, einem DNA Reparaturprotein, in den „bystander“ Zellen, aber nicht in den bestrahlten Zellen (Iyer und Lehnert 2002).

Zusammenfassend sprechen die angeführten Befunde für einen „bystander“-Effekt der durch lösliche Faktoren vermittelt wird, die von bestrahlten Zellen stammen. Dennoch ist es unumgänglich die mechanistische Basis zu untersuchen und die wichtigsten Bestandteile, die am „bystander“-Effekt beteiligt sind, zu identifizieren. Nur so wird es möglich sein, die bestehenden Unstimmigkeiten zu klären.

1.4 „Bystander“-Effekte durch partielle Bestrahlung

Bei dieser Art von Experimenten werden nur einige Zellen der Kultur bestrahlt, hauptsächlich mit hoch LET Partikeln und die Reaktion der nicht bestrahlten Zellen wird untersucht. Dabei wird entweder eine definierte Fraktion von Zellen bestrahlt ohne einzelne Zellen zu kennzeichnen, oder es werden eindeutig gekennzeichnete Zellen mit einer Microbeam Anlage bestrahlt und die Mutation der eindeutig nicht bestrahlten Zellen wird untersucht. Aufgrund der experimentellen Anforderungen werden in den meisten Experimenten Protonen oder α -Teilchen verwendet, während in den oben genannten

Protokollen die Mediumtransfer beinhalteten, weitgehend niedrig LET Strahlung wie z.B. Röntgen- oder Gammastrahlen verwendet wurden, jedoch keine α -Teilchen.

Die ersten Hinweise auf einen „bystander“-Effekt nach partieller Bestrahlung einer Zellkultur erhielt man aus einer Studie über Schwesterchromatid Austausche (SCEs) in Monolayer-Zellkulturen nach Bestrahlung mit α -Partikeln. Bei dieser Art von Bestrahlung wird nur ein sehr kleiner Teil der Zellpopulation von einem α -Partikel getroffen (Nagasawa und Little 1992). Unter diesen Bedingungen wurde in 20-40% der Zellen eine Erhöhung der SCEs beobachtet, wobei eigentlich nur 0,1-1% der Zellkerne von einem α -Teilchen durchquert wurde. Diese Beobachtungen wurden später an menschlichen Lungenfibroblasten bestätigt (Deshpande et al. 1996). Auch hier kam es zu einer Erhöhung der SCEs nach Bestrahlung mit α -Teilchen. 23% der Zellen zeigten eine erhöhte Anzahl von SCEs, obwohl weniger als 3% der Zellen von einem α -Partikel getroffen wurden.

Weiterführende Studien ergaben, dass die Sekretion von Cytokinen oder anderen Faktoren durch die bestrahlten Zellen zu einer Hoch-Regulation des oxidativen Metabolismus in den „bystander“-Zellen führen (Narayanan et al. 1997a). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von konfluenten menschlichen Fibroblasten mit geringen Dosen von α -Partikeln zu einer unerwartet hohen Anzahl von DNA-Schäden führt. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der Zellzyklus regulierenden Proteine p53 und p21 innerhalb der Zellpopulation, wobei auch hier nur ein geringer Prozentsatz der Zellen getroffen wurde (Azzam et al. 1998). Nagasawa und Little zeigten mit einer geringen Anzahl von α -Partikeln eine Erhöhung der Mutationsrate, so dass Mutationen auch in Zellen entstanden sein müssen, die nicht direkt von einem α -Teilchen getroffen wurden (Nagasawa und Little 1999).

In all diesen Experimenten spielt die gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation eine große Rolle, und die Beteiligung von Connexin 43 an der Entwicklung von „bystander“-Effekten konnte nachgewiesen werden (Azzam et al. 2001). Seit bekannt ist, dass gap junctions nur von Molekülen mit einem Molekulargewicht < 1 Kilo Dalton passiert werden können, berücksichtigt man Moleküle bis zu dieser Größe zur Erklärung des „bystander“-Effektes. Dieser Aspekt der „bystander“-Reaktion ist ein Hauptbestandteil dieser Arbeit und wird im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben.

Um „bystander“-Effekte in partiell bestrahlten Zellkulturen besser untersuchen zu können, stehen weltweit mehrere Microbeam Anlagen zur Verfügung. Der Vorteil dieser Anlagen ist, dass eine gezielte Bestrahlung von einzelnen Zellen innerhalb einer Kultur

möglich ist und die Antwort der nicht bestrahlten „bystander“ Zellen gezielt untersucht werden kann.

Zirkle entwickelte 1953 eine Methode, mit der eine Hochenergie Bestrahlung von Zellteilen unter Verwendung eines Protonen Microbeams mit einem Durchmesser kleiner als $2,5\text{ }\mu\text{m}$ möglich wurde (Zirkle 1953). Seit kurzem besteht wieder ein erhöhtes Interesse an Microbeams. Denn heute ist es möglich, Nutzen aus neuen Entwicklungen in Bezug auf Partikel Abgabe, Fokussierung, Detektion, Bildbearbeitung, Wiedererkennung und Computer zu ziehen, und so die zelluläre Reaktion auf Strahlenschäden in einzelnen Zellen zu untersuchen (Randers-Pehrson et al. 2001). Das biologische Interesse am Microbeam beruht darauf, dass genau definiert werden kann, welche ionisierende Energie von einer Zelle absorbiert wird, im Bezug auf Raum, Zeit und Menge.

Mit dem Microbeam können viele Zellen bestrahlt und es können Teile des Cytoplasmas oder des Zellkerns exponiert werden. Diese Möglichkeiten erlauben, Fragen nach Zell-Zell-Kommunikation und Funktionen von Untereinheiten innerhalb der Zelle zu stellen. Umgekehrt erlaubt die Microbeam Technik, dass ausgewählte Zellen oder zelluläre Komponenten innerhalb einer bestrahlten Zellpopulation unbestrahlt bleiben. So können „bystander“-Effekte direkt untersucht werden. Ferner können Zellen mit Partikeln in bestimmten Zeitabständen beschossen werden, so dass Reparaturkinetiken untersucht werden können.

Die Experimente in diesem Projekt wurden in Kooperation mit der PTB in Braunschweig durchgeführt. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über eine solche Anlage.

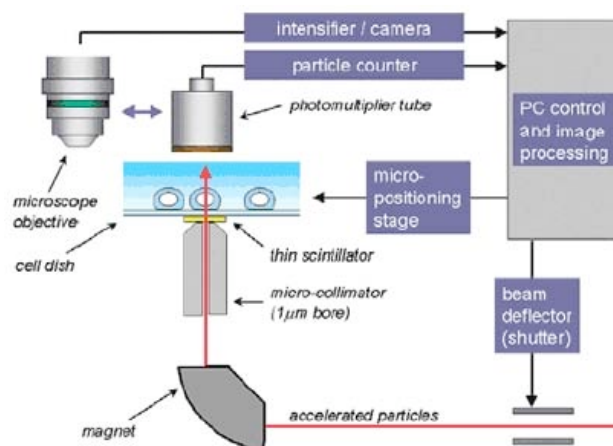


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Microbeam Anlage

(aus: Gray Cancer Institute; www.graylab.ac.uk)

Eine Microbeam Anlage, mit der seit Jahren gearbeitet wird, befindet sich im Gray Laboratorium bei London. Die ersten Experimente mit dem Microbeam zielten auf die Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung. Wenn 5 oder 10 Partikel gezielt in einer Zelle, die von mehreren Zellen umgeben ist, geschossen werden, dann ist die Zahl der gemessenen Mikronuklei und apoptotischen Zellen in der Umgebung der getroffenen Zelle höher als erwartet (Prise et al. 1998). Die Anzahl der Partikel (5 oder 10) pro Zielzelle hat dabei keinen Einfluss auf die Anzahl der Zellen, die „bystander“-Effekte zeigen, bzw. sie ändern nicht das Verhältnis von apoptotischen Zellen zu Mikronuklei. Belyakov hat eine Zelle einer primären menschlichen Fibroblasten-Population bestehend, aus 600-800 Zellen, mit 1 und 15 Helium Ionen beschossen. Die geladenen Partikel trafen mit einer Genauigkeit von $\pm 2 \mu\text{m}$ das Zentrum des Zellkerns und die Detektier- und Zähleffizienz war größer als 99%. Drei Tage später wurden, obwohl nur eine einzelne Zelle getroffen wurde, zusätzlich 80-100 geschädigte Zellen in der Population gezählt. Die Zahl der geschädigten Zellen war unabhängig von der Anzahl der geladenen Partikel, mit der die Zielzelle beschossen wurde. Eine 2-3 fache Erhöhung des Schadens wurde ebenfalls beobachtet, wenn 1 oder 4 Zellen innerhalb der Population bestrahlt wurden. Bei Bestrahlung von 200 Zellen innerhalb eines Quadranten einer Petrischale kam es zu einer 2-3 fachen Erhöhung des Schadens im Nachbarquadranten, der nicht bestrahlt wurde (Belyakov et al. 2001).

Die sogenannte „ureter primary explant technique“ wurde entwickelt, um „bystander“-Effekte unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen zu studieren, wo sowohl Stamm- als auch ausdifferenzierte Zellen anwesend sind. Die Bestrahlung erfolgte hierbei mit einem $^3\text{He}^{2+}$ geladenen Partikel Microbeam im Gray Cancer Institut mit einer Genauigkeit von annähernd $2 \mu\text{m}$. Gewebeteile aus dem Harnleiter eines Schweines wurden mit 10^3 $^3\text{He}^{2+}$ Partikeln (5 MeV; LET 70 keV micrometer⁻¹) pro Zielort vorbestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden diese Gewebeteile für 7 Tage inkubiert. Der gesamte zelluläre Schaden (Gesamtzahl an Mikronuklei und apoptotischen Zellen) wurde gemäß den morphologischen Kriterien gemessen. Apoptose wurde mit Hilfe der 3'-OH DNA-Markierungstechnik ebenfalls untersucht. Die frühe Differenzierung wurde mit Antikörpern gegen Uroplakin II, einem spezifischen Marker für urotheliale Differenzierung, bestimmt. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen eine signifikante „bystander“ induzierte Differenzierung und eine weniger signifikante Zunahme an apoptotischen Zellen und Mikronuklei. Daraus entstand die Hypothese, dass die „bystander“-Effekte eine schützende Funktion ausüben (Belyakov et al. 2002).

Eine weitere Microbeam Anlage die seit Jahren in Betrieb ist, befindet sich in der Columbia Universität, New York. Diese Anlage wird von der Gruppe um Tom Hei genutzt, um „bystander“-Effekte nach Bestrahlung mit α -Partikeln zu untersuchen. Als Endpunkt wurde unter anderem die Mutationsrate untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass nicht bestrahlte Zellen, die in der Nähe von bestrahlten Zellen lagen, Mutationen zeigten (Hei et al. 1997, Wu et al. 1999). Mit Hilfe von multiplex PCR wurde festgestellt, dass sich das Spektrum der Mutationen in den „bystander“-Zellen von den Mutationen unterscheidet, die spontan entstehen, und es ähnlich dem Spektrum in direkt bestrahlten Zellen ist. Interessanter Weise wurden die Mutationen auch in Zellen gefunden, bei denen das Cytoplasma mehr exponiert wurde als der Zellkern. Das würde für das Vorliegen eines intrazellulären „bystander“-Effektes sprechen (Wu et al. 1999).

In einer besonders interessanten Reihe von Experimenten untersuchten Belyakov *et al.* Primärkulturen von menschlichen und Uroepithelzellen des Schweines, um die räumliche Verteilung von verschiedenen Schadensendpunkten nach Bestrahlung einer einzelnen Zelle mit Partikeln zu ermitteln (Belyakov et al. 2000). Nur Zellen, die sich aktiv teilten, zeigten Schäden, wie z.B. Apoptose, Induktion von Mikronuklei, Nekrose, unabhängig von der Lage der bestrahlten Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass nur Zellen, die sich aktiv teilen, einen „bystander“-Effekt aufweisen.

Sowohl die oben beschriebenen Experimente mit partieller Bestrahlung als auch die im vorherigen Kapitel beschriebenen Mediumtransfer-Experimente stimmen mit der Idee überein, dass eine kleine Zellpopulation und eine kleine Bestrahlungsdosis ausreichend sind, um einen „bystander“-Effekt auszulösen, wenn die Zellen in der Lage sind, das „bystander“-Signal zu erkennen. Eine weitere Hauptaufgabe besteht darin heraus zu finden, welcher Mechanismus an der Signal Produktion und Transduktion beteiligt ist. Der bisherige Stand der Erkenntnisse erlaubt keine Aussage über die Dosis bzw. die LET Abhängigkeit bezüglich der „bystander“-Effekte. Die Vermutung liegt nahe, dass „bystander“-Effekte in kompetenten Zellen entstehen können, wenn eine bestimmte Grenzdosis überschritten wird unabhängig vom LET (Mothersill und Seymour 2001).

1.5 Die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Induktion von „bystander“-Effekten

Obwohl die Mediumtransfer-Experimente für einen löslichen extrazellulären Faktor sprechen, der an der Entwicklung von „bystander“-Effekten beteiligt ist (Mothersill und Seymour 1997b, Belyakov et al. 2001), scheint es bei der partiellen Bestrahlung so zu sein,

dass die Übertragung von kleinen Molekülen über gap junctions eine entscheidende Rolle spielt (Zhou et al. 2000, Azzam et al. 2001). Da die interzelluläre Kommunikation über gap junctions an der Entwicklung von „bystander“-Effekten wahrscheinlich beteiligt sind, soll im folgenden ein kurzer Überblick über gap junctions gegeben werden.

Gap junction Kanäle verbinden benachbarte Zellen miteinander und erlauben den interzellulären Austausch von Ionen sowie von polarisierten und unpolarisierten Molekülen mit einem Molekulargewicht < 1 Kilo Dalton. Die gap junction Kanäle werden aus dem Protein Connexin gebildet (Simon 1998, Andrade-Rozental et al. 2000, Evans und Martin 2002, Gellhaus et al. 2004). Ein gap junction Kanal besteht aus zwei Hemikanälen, den sogenannten Connexonen. Jedes Connexon besteht wiederum aus sechs Connexinen, die um eine wassergefüllte Pore angeordnet sind. Mittlerweile wurden 21 Mitglieder der Connexin Gen Familie im menschlichen Genom identifiziert (Willecke et al. 2002, Sohl und Willecke 2003). In Abbildung 3 ist die Struktur der gap junctions schematisch dargestellt.

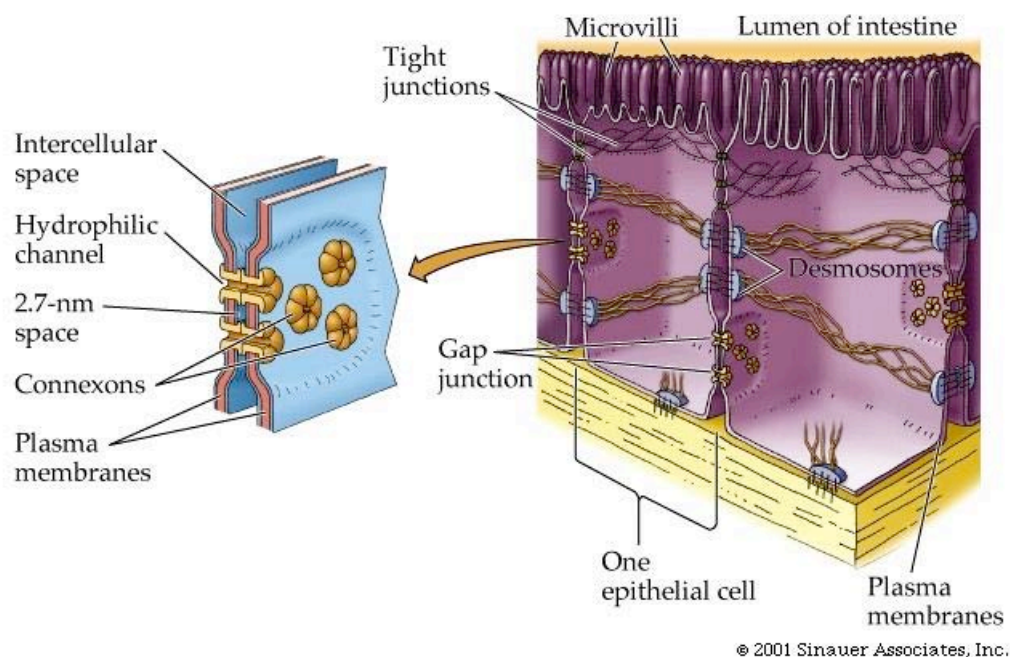


Abb. 3: Schematische Übersicht über gap junctions

(aus: www.winona.msus.edu/bates/Bio241/images/figure-05-06c.jpg)

Eine Beteiligung von gap junction vermittelter interzellulärer Kommunikation an der Entwicklung von „bystander“-Effekten wurde in vielen verschiedenen Studien nachgewiesen.

Wenn man Mikrokolonien, die aus 1-50 Zellen bestehen, mit Gammastrahlen bestrahlt, dann reagieren die Mikrokolonien genauso, wie eine einzelne Zelle auf

Bestrahlung reagiert. Die anfängliche Überlebensrate ist relativ konstant unabhängig davon, aus wie vielen Zellen die Mikrokolonie zum Zeitpunkt der Bestrahlung bestand. Bei Bestrahlung von Kolonien oder Monolayern bestätigt sich dieses Ergebnis und ferner werden Zellen, die in Kolonien bestrahlt werden, mehr geschont als Zellen, die einzeln bestrahlt werden. Dieser Effekt zeigt sich nicht, wenn die gap junctions geschlossen sind. Ist die interzelluläre Kommunikation während oder kurz nach der Bestrahlung durch den Einsatz von Nitrosamin oder TPA blockiert, zeigen die Zellen dieselbe Überlebens- und letale Mutationsrate wie einzelne Zellen bei Bestrahlung (Mothersill und Seymour 1997a). Diese Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass Zellen miteinander kommunizieren und dass diese Kommunikation Einfluss auf die Folgen nach Bestrahlung haben kann.

Azzam *et al.* (1998) konnten ebenfalls zeigen, dass unter Einfluss von Lindan, einem gap junction Inhibitor, das Ausmaß des „bystander“-Effektes signifikant reduziert wird. Die Daten implizieren, dass die interzelluläre Kommunikation eine wichtige Rolle beim „bystander“-Effekt spielt. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Bestrahlung von zufällig ausgewählten A_L Zellen gemacht. Zellen die mit 20 α -Partikeln beschossen wurden, zeigten eine Mutationsrate, die dreifach höher lag als erwartet. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Radikalfänger DMSO hatte keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Mutationen. Im Gegensatz dazu führte eine Vorbehandlung der Zellen mit 40 μ M Lindan zu einer signifikanten Abnahme der Mutationsrate, was wiederum für eine Beteiligung der interzellulären Kommunikation an der „bystander“-Reaktion spricht (Zhou *et al.* 2000). Auch die Bestrahlung von 10% einer konfluenten Zellpopulation mit einem α -Partikel führt zu einer Mutationsrate, die genauso hoch ist, als wenn man alle Zellen der Population bestrahlt hätte. Dieser Effekt wird signifikant unterdrückt, wenn die Zellen mit 1 mM Octanol vorinkubiert werden, denn Octanol führt zu einer Inhibierung der gap junction vermittelten Kommunikation. Diese Ergebnisse wurden auch an Zellen, die mit negativ dominantem Connexin transfiziert sind, beobachtet. Diese Zellen zeigten eine reduzierte Mutationsfrequenz, wie man sie auch in einer Zellpopulation ohne „bystander“-Effekt erwarten würde. Das bestätigt die Wichtigkeit der interzellulären Kommunikation in der bystander Reaktion (Zhou *et al.* 2001).

Zusätzlich wurde eine Hochregulation von p21 in „bystander“-Zellen verhindert, wenn die Zellen mit Lindan behandelt wurden. Das könnte ein Anzeichen dafür sein, dass interzelluläre Kommunikation eventuell am Signalweg beteiligt ist (Azzam *et al.* 2001). Dennoch gibt es überzeugende Beweise, dass „bystander“-Effekte auch ohne gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation auftreten. Mothersill *et al.* (1998b) zeigten, dass

Zell-Zell-Kontakte während einer Bestrahlung mit γ -Strahlen nicht notwendig sind, um einen „bystander“-Effekt in menschlichen Keratinocyten hervor zu rufen. Diese Signalwege benötigen keine interzelluläre Kommunikation über gap junctions, um „bystander“-Effekte zu vermitteln. In menschlichen Keratinocyten treten „bystander“-Reaktionen auf, die, wie es scheint, in einem Dosisbereich von 0,03-0,05 Gy gesättigt sind (Seymour und Mothersill 2000). Diese Effekte können nach Bestrahlung mit niedrig LET Strahlung auch ohne gap junction vermittelnde Kommunikation auftreten (Mothersill et al. 2000, Mothersill et al. 2001).

Es scheint so, als ob die interzelluläre Kommunikation zwar einen erheblichen Beitrag zu den „bystander“-Effekten leistet, aber nicht immer benötigt wird, um eine „bystander“-Reaktion auszulösen. In dieser Arbeit wird die Beteiligung der interzellulären Kommunikation an der Entwicklung von „bystander“-Effekten genauer untersucht.

1.6 Die biologische Bedeutung der „bystander“-Effekte

Es gibt zwei Theorien bezüglich der Bedeutung von „bystander“-Effekten. Die eine Theorie besagt, dass „bystander“-Effekte indirekt toxisch sind, was das Ausmaß der Strahlenschäden erschwert und eine Prognose im Bezug auf den Strahlenschutz schwierig macht. Diese Ansicht wird von der Forschungsgruppe an der Columbia Universität vertreten. Bezogen auf die Krebshäufigkeit bei den Überlebenden des Atombombenangriffs auf Hiroshima und Nagasaki, haben die Internationale Strahlenschutzkommission (ICRP) und der Nationalrat für Strahlenschutz und Messung (NCRP) empfohlen, dass Schätzungen für das Krebsrisiko im niedrig Dosisbereich aus dem hohen Dosisbereich extrapoliert werden. Dazu wird die lineare Extrapolation aus dem mittleren Dosisbereich bis zur Dosis Null verwendet ohne Annahme einer Schwellendosis (LNT-Modell, linear non-threshold model). Diese Empfehlung beruht auf der Überlegung, dass die DNA im Zellkern das Hauptziel bei strahlungsinduzierter Genotoxizität ist und da im niedrigen Dosisbereich weniger Zellen direkt geschädigt sind, sollte der schädliche Effekt der Bestrahlung proportional abnehmen.

Zhou *et al.* (2001) haben mit einem Microbeam eine Fraktion (entweder 100% oder 10%) von Zellen in einer konfluenten Population bestrahlt. Dabei wurde jeder Nukleus von genau einem Partikel getroffen. Tatsächlich führt die Bestrahlung von 10% einer konfluenten Zellpopulation mit einem einzelnen α -Partikel pro Zelle zu erhöhten Mutationen, die man auch beobachtet, wenn alle Zellen in einer Population bestrahlt worden sind. Der Effekt wird in Zellen, die mit 1 mM Octanol behandelt wurden oder in

Zellen, die kein Connexin 43 exprimieren, signifikant unterdrückt. Daraus ergibt sich, dass das relevante Ziel für die Strahlungsmutagenese größer ist als eine einzelne Zelle. Diese Beobachtung ist von großer Bedeutung bei der Erstellung von Modellen zur Kalkulation der Risiken besonders bei der Bestrahlung mit α -Partikeln.

Die Bestrahlung von 10% der Zellen einer Population hat die gleiche Mutationserhöhung zur Folge, wie wenn alle Zellen bestrahlt wären. Das führt zu der Annahme, dass Bestrahlung mit α -Partikeln einer niedrigen Dosis zu einer großen mutagenen „bystander“-Antwort in den benachbarten, nicht bestrahlten Zellen führt. Das genotoxische Risiko im niedrigen Dosisbereich würde so in der gängigen Strahlenschutzpraxis erheblich unterschätzt. Dies ist umso bedeutsamer, weil strahleninduzierte „bystander“-Effekte bei Bestrahlung mit Röntgen- oder γ -Strahlen, die beide einen niedrigen linearen Energietransfer aufweisen, aufgetreten sind (Mothersill und Seymour 1998a, 2001).

Die zweite Theorie geht davon aus, dass „bystander“-Effekte eine schützende Reaktion darstellen, die möglichst viele der potentiell geschädigten Zellen entfernen soll. Diese Idee wurde zum ersten Mal von Belyakov und der Gruppe aus dem Gray Laboratorium geäußert. Wenn ein kleiner Prozentsatz (1-2%) menschlicher Fibroblastenkerne mit $^3\text{He}^{2+}$ Partikeln beschossen wird, dann ist die Anzahl der Mikronuklei und der apoptotischen Zellen höher als erwartet (Prise et al. 2000). Eine weitere Besonderheit ist, dass eine 2-3 fache Erhöhung der Hintergrundfrequenz von Mikronuklei und apoptotischen Zellen bezogen auf die Kontrollen beobachtet wurde, wenn die gleiche Anzahl Partikel auf Orte außerhalb der Zellkerne eingewirkt hat. Keine signifikante Zunahme des Effektes wurde beobachtet, wenn die Anzahl der Partikel pro Zellkern erhöht wurde. Wenn der Zell-Zell-Kontakt minimal ist und die geschädigten Zellen zufällig verteilt sind, dann ist die Freisetzung eines toxischen Faktors in das Medium wahrscheinlicher als die interzelluläre Kommunikation über gap junctions, die das Cytoplasma benachbarter Zellen miteinander verbinden.

All die oben diskutierten Ergebnisse, die mit dem Zelltod zusammenhängen, würden eine „schützende“ Rolle von „bystander“-Effekten im Bezug auf die Krebsentstehung durch niedrige Dosen implizieren. Der Zelltod von nicht direkt geschädigten Zellen könnte eine gemeinsame Antwort des Mikroumfeldes sein, die gezielt geschädigte oder potentiell geschädigte Zellen eliminiert, um die Leistungen eines bestimmten Organs oder Gewebes zu optimieren. So gesehen würden „bystander“-Effekte

ein Krebsrisiko im niedrigen Dosisbereich bewirken, das kleiner ist als gemäß dem LNT-Modell erwartet wird (Ballarini 2002).

Bevor die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dargestellt werden, wird im folgenden ein kurzer Überblick über die untersuchten Endpunkte gegeben.

1.7 Übersicht über den Zellzyklus

Eukaryotische Zellen haben ein komplexes Netzwerk regulierender Proteine entwickelt, das sogenannte „Zellzyklus-Kontrollsystem“, welches das Durchlaufen des Zellzyklus überwacht. Dieses System kontrolliert die wichtigsten Ereignisse des Zellzyklus, einschließlich der DNA-Replikation und Aufteilung der verdoppelten Chromosomen. Innerhalb der Zelle überwacht das Kontrollsystem den Fortgang des Zellzyklus und verzögert spätere Ereignisse solange, bis vorangegangene Stadien abgeschlossen sind. Beispielsweise wird die Vorbereitung der Chromosomentrennung blockiert, bis die DNA-Replikation vollendet ist. Zusätzlich überprüft das System auch die Bedingungen, die ausserhalb der Zelle herrschen.

Die grundlegende Funktion des Zellzyklus ist die Verdopplung der DNA und deren gleichmäßige Verteilung auf die beiden Tochterkerne. Der eukaryotische Zellzyklus wird in vier aufeinander folgende Phasen aufgeteilt: G₁, S, G₂ und M. Während der S-Phase (S für Synthese) erfolgt die Verdopplung der DNA. Auf die S-Phase folgen Chromosomentrennung und Zellteilung in der M-Phase (M für Mitose). In den meisten Zellzyklen sind zusätzliche Lücken eingeschoben, G- oder Gap-Phase (engl.: gap = Lücke) genannt. Eine G₁-Phase zwischen M-Phase und S-Phase, sowie eine G₂-Phase zwischen S-Phase und Mitose. G₁, S und G₂ werden zusammen als Interphase bezeichnet. Die beiden Gap-Phasen ermöglichen nicht nur das Zellwachstum, sondern sie geben der Zelle auch Zeit, die Bedingungen innerhalb und ausserhalb der Zelle zu verfolgen. Wenn die Umweltbedingungen ungünstig sind, dann können die Zellen das Durchlaufen der G₁-Phase verzögern und können in einen Ruhezustand eintreten, die sogenannte G₀-Phase.

Bekommen die Zellen jedoch Signale für Teilung und Wachstum, durchlaufen die Zellen ausgehend von der G₁- oder auch von der G₀-Phase einen Festlegungspunkt, nach dem es kein Zurück mehr gibt. Dieser Punkt liegt kurz vor dem Ende von G₁ und wird als Restriktionspunkt bezeichnet. Abbildung 4 zeigt eine schematische Übersicht über die Phasen des Zellzyklus.

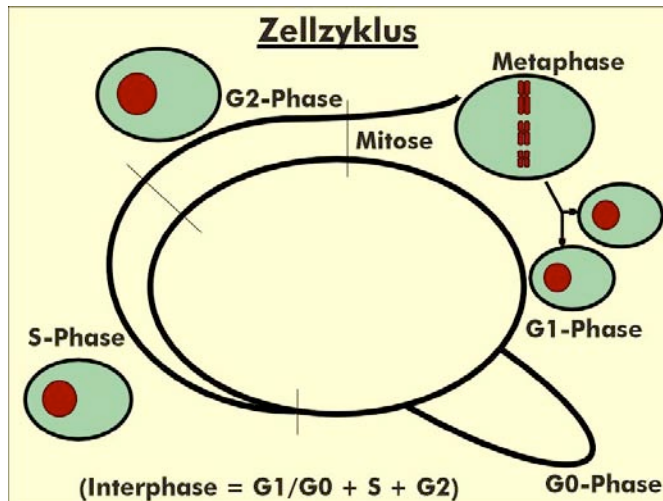


Abb. 4: Die Phasen des Zellzyklus.

In der M-Phase finden nacheinander Mitose und Cytokinese statt; in der Interphase wächst die Zelle kontinuierlich. Die Interphase gliedert sich in G₁, S und G₂-Phase. Nur während der S-Phase wird DNA repliziert.

G₁ ist die Lücke zwischen M-Phase und S-Phase, G₂ die Lücke zwischen S-Phase und M-Phase

1.8 DNA-Schadens-Kontrollpunkte

Zellen haben komplizierte Mechanismen entwickelt, um die Unversehrtheit des Genoms sicherzustellen, damit eine getreue Wiedergabe der genetischen Information gewährleistet ist (Fei und El-Deiry 2003).

Wenn Chromosomen beschädigt sind, zum Beispiel durch ionisierende Strahlung, müssen sie repariert werden, bevor die Zelle versucht, sie zu verdoppeln oder zu trennen. Das Zellzyklus-Kontrollsystem erkennt die DNA Schäden und hält den Zellzyklus an sogenannten DNA-Schadens-Kontrollpunkten an. Die meisten Zellen besitzen zwei Kontrollpunkte: einen Kontrollpunkt in der späten G₁-Phase, der den Eintritt in die S-Phase verhindert und den zweiten Kontrollpunkt in der späten G₂-Phase, der den Eintritt in die Mitose verhindert.

Die Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung führt zur Aktivierung des Genregulatorproteins p53. Das Tumor Suppressor Gen p53 ist an der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA Reparatur und der Aktivierung von Apoptose beteiligt (Hupp et al. 1992, El-Deiry 1998). Abbildung 5 fasst die Hauptaufgaben von p53 zusammen.

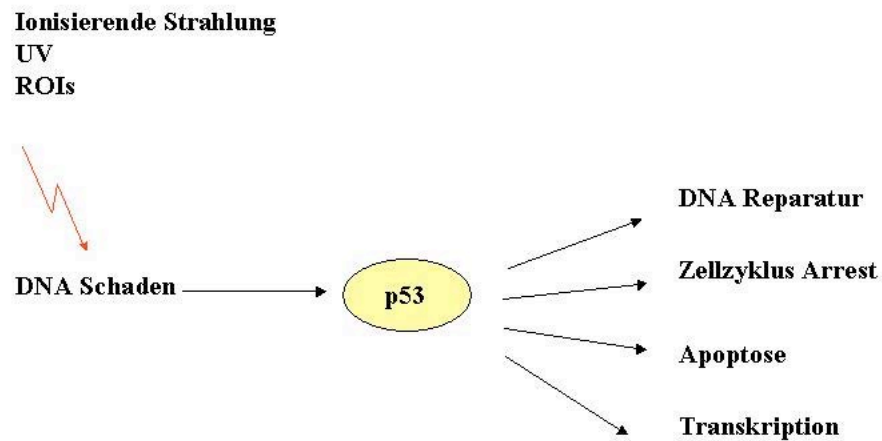


Abb. 5: Beteiligung von p53 an verschiedenen Vorgängen im Zellzyklus; ROI: reactive oxygen species

Als Antwort auf einen DNA-Schaden, zeigen die Zellen eine schnelle Erhöhung des Wildtyp Proteins p53, die korreliert ist mit einem temporären G₁ Arrest. Es wurde postuliert, dass durch diesen G₁ Arrest der Zelle Zeit zur Verfügung gestellt wird, um den DNA Schaden zu reparieren, bevor die DNA kopiert wird. Des weiteren wird vermutet, dass p53 eine Rolle spielt bei der Regulation des G₂ / M Arrestes im Zellzyklus. Wenn eine Reparatur nach einem DNA Schaden nicht möglich ist, fördert p53 die Apoptose. Daher wird p53 oft als „guardian of the genome“ bezeichnet (Lane 1992). p53 ist ein nukleares Phosphoprotein, das aus 393 Aminosäuren besteht und sich aus 4 Domänen zusammensetzt: eine Domäne, die Transkriptionsfaktoren aktiviert, eine Domäne, die spezifische DNA Sequenzen erkennt (core Domäne), eine Domäne für die Tetramerisation von Proteinen und eine Domäne, die geschädigte DNA erkennt. Abbildung 6 zeigt eine schematische Übersicht über die Struktur von p53.

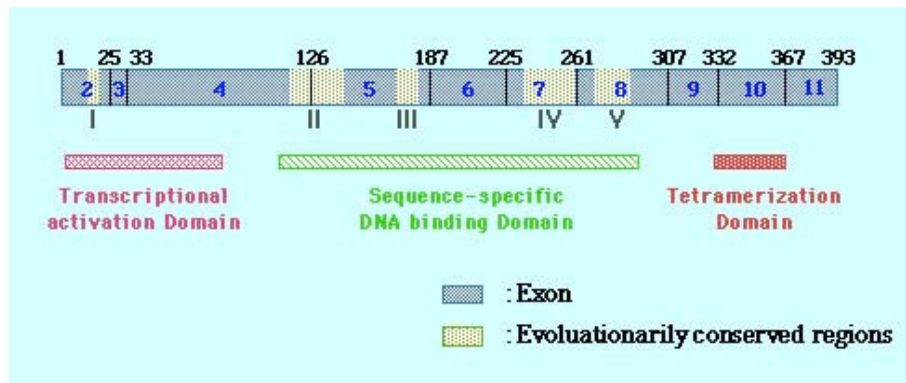


Abb. 6: Struktureller Aufbau von p53. Erklärung im Text

(aus: http://p53.genome.ad.jp/documents/about_p53.html)

Bei über 50% der Tumore ist das p53 mutiert (Hollstein et al. 1991). Die meisten Mutationen sind in der DNA Binde-Domäne lokalisiert, so dass die korrekte Transkription des p53 nicht mehr gewährleistet ist. Das führt dazu, dass die Fähigkeit von p53 einen Zellzyklus-Stopp bzw. Apoptose oder sogar beides auszulösen, blockiert ist (Michalovitz 1991, Hollstein 1994, Hussain 1999).

1.9 Mikronuklei

Mikronuklei („kleine Kerne“) sind ehemalige Bestandteile des Zellkernes, die aufgrund verschiedener Schäden am Erbmateriale (Chromosomen-Fragmente, dizentrische Chromosomen) im Cytoplasma einer Zelle, also außerhalb des Zellkernes auftauchen.

Voraussetzung für die Mikronukleusexpression ist, dass die Zelle durch eine Kernteilung gegangen ist. Zellen, deren Kerne sich nicht geteilt haben, können keinen Mikronukleus aufweisen und würden zum Teil fälschlicherweise als ungeschädigte Zellen gewertet werden. Um die Frage zu klären, ob eine Zelle die Mitose durchlaufen hat oder nicht, setzten Fenech und Morley (1985a, 1985b) Cytochalasin B ein. Die Eigenschaft dieser Chemikalie besteht darin, zwar eine Kernteilung zuzulassen, nicht jedoch eine Zellteilung. Die Zellen, die eine Mitose durchlaufen haben, sind also daran zu erkennen, dass sie zwei Zellkerne aufweisen („binukleate Zellen“). Nur in solchen „zweikernigen“ Zellen werden die Mikronuklei gezählt. Seit der Einführung dieser Technik haben Mikronuklei als biologische Indikatoren weltweit Beachtung gefunden (Müller und Streffer 1993). Dies liegt vor allem daran, dass die Mikronukleusauswertung im Gegensatz zur Auswertung der dizentrischen Chromosomen relativ einfach und schnell ist. Zellen, die Mikronuklei

exprimieren, sind ebenso wie die Zellen mit dizentrischen Chromosomen instabile Zellen (Müller und Streffer 1993). Daher kommt es innerhalb weniger Monate zu einem Verlust dieser Zellen und der direkte Strahleneffekt kann dann nicht mehr festgestellt werden.

1.10 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Informationen zu erhalten über das dem „bystander“-Effekt zugrunde liegende Phänomen, und besonders die Rolle der interzellulären Kommunikation in dessen Entwicklung zu untersuchen. Diese Arbeit ist ein erster Schritt, die Prozesse zu untersuchen, die „bystander“-Effekte verursachen. Das weiter führende Ziel ist es, zum molekularen Verständnis der „bystander“-Effekte beizutragen und die dabei gewonnenen Informationen anzuwenden, um die schädlichen Effekte von ionisierender Strahlung zu reduzieren.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Messung von gap junction vermittelter interzellulärer Kommunikation (GJIC). Bisher wurde die interzelluläre Kommunikation gemessen, indem die Zellen mit gap junction permeablen Farbstoffen wie z.B. Lucifer yellow, Carboxyfluorescein, Neurobiotin, Ethiumbromid oder Propidiumiodid gefärbt wurden. Anschließend wurden die angrenzenden Zellen gezählt, in denen sich der Farbstoff ausgebreitet hat (Safranyos et al. 1987, Elfgang et al. 1995, Cao et al. 1998). Diese Methode hat jedoch mehrere Nachteile:

1. die Permeabilität dieser Farbstoffe hängt von der Isoform der Connexine ab
2. das Auszählen der Zellen ist subjektiv
3. die Ergebnisse sind qualitativ und erlauben keine quantitative Auswertung des eigentlichen Grades der interzellulären Kommunikation über gap junctions

Um diese Probleme zu lösen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Färbetechnik etabliert, die auf dem *Parachute Assay* (Ziambaras et al. 1998, Czyz et al. 2000) beruht und für diese Arbeit modifiziert wurde. Bei dieser Technik werden die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenz-Farbstoffe Calcein AM und DiI gefärbt und anschließend wird der Kopplungsgrad mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie ermittelt.

Ein anderer Teil der Arbeit bestand darin, Co-Kultivierungsexperimente zu entwickeln, bei denen die „bystander“-Reaktion in unbestrahlten Zellkulturen untersucht werden kann. Die Zellkulturen bestanden aus einer unbestrahlten und einer bestrahlten Zellkultur, die für verschiedene Zeiträume nach Bestrahlung co-kultiviert wurden. Als

Strahlungsquellen wurden sowohl Röntgenstrahlung (niedrig LET) als auch die Bestrahlung mit Neutronen (hoch LET) verwendet. Es sollten experimentelle Ansätze entwickelt werden, die es erlauben, „bystander“-Effekte zu untersuchen, ohne partielle Bestrahlung mit einem Microbeam und ohne Mediumtransfer. Im ersten Ansatz wurde eine Zellpopulation mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes DiI markiert, so dass durch anschließendes Sortieren der Zellen eine getrennte Untersuchung der Zellreaktion sowohl der bestrahlten Zellpopulation als auch der unbestrahlten Zellpopulation ermöglicht wurde. Dieser Versuchsaufbau eröffnet neue Wege zur Untersuchung von „bystander“-Effekten mit einer großen experimentellen Flexibilität.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die bestrahlten Zellen von den unbestrahlten Zellen durch ein permeables Membransystem voneinander getrennt. Die Zellen teilen sich zwar das Medium, aber sie stehen nicht in direktem Kontakt miteinander. Auf diese Weise können „bystander“-Effekte durch Mediumtransfer untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Bio-Flow sterile Werkbank	CEAG
Biofuge fresco	Kendro
CO ₂ Begasungsschrank Typ 4500E	Nuaire
Epics XL-MCL TM	Beckman Coulter
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
HERASAFE HS12	Kendro
HI 9024 microcomputer pH meter	Hanna Instruments
HLC KühlBlockThermostat KBT 100-2P	Oehmen
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Mini-Protean 3 cell	Bio-Rad
Multifuge 3 S-R	Kendro
PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad
Röntgengerät PANTAX-Seifert	Pantax-Seifert
Schüttler Typ Rocky 3D	Oehmen
Typhoon 9410	Amersham Biosciences
Ultraschall-Homogenisator Typ LABSONIC U	Oehmen
UV-2401 PC Spektralphotometer	Shimadzu
Versa Doc Imaging System Modell 5000	Bio-Rad
Z2 Coulter Particle Counter and Size Analyser	Beckman Coulter
Zellsorter Coulter ^R Epics ^A Altra TM	Beckman Coulter

Alle weiteren Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

2.2 Plastikgefäße und Einwegmaterial

Plastikgefäße und Einwegartikel wurden von der Firma Greiner Bio-One bezogen.

2.3 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
β-Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth
Ammoniumpersulfat	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Calcein-AM (Kat. Nr.: C-3100)	MoBiTec
Cell Tracker™ CM-DiI (Kat. Nr.: C-7001)	MoBiTec
Chemi Glow™ Chemiluminescent Substrate	Alpha Innotec
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMSO	Serva
EDTA	Roth
Ethanol	J. T. Baker
Filter Papier Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Hybond-PVDF Membran	Amersham Biosciences
Hydrocortison	Sigma
Isopropanol	Riedel de Haen
Isoton II	Beckman Coulter
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L-Glutamin	Sigma
Methanol	J. T. Baker
Milchpulver (non-fatty)	Wal-Mart (nur in USA erhältlich)
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Merck
NP-40	Sigma
Penicillin G	Sigma
Propidiumiodid	Calbiochem

Proteinase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
RNase	Sigma
SP-DiIC ₁₈ (3) (Kat. Nr.: D-7777)	MoBiTec
Streptomycin	Calbiochem
TEMED	Sigma
Tris	Roth
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Serva
Versene	Gibco
Vybrant® DiI cell - labeling solution (Kat. Nr.: V-22885)	MoBiTec

Weitere hier nicht aufgeführte Chemikalien werden an entsprechender Stelle im Methodenteil beschrieben, oder wurden von verschiedenen Herstellern in Analysequalität bezogen.

2.4 Protein-Molekulargewichtsstandards

Name	Bezugsquelle	Proteingrößen (kDa)
PageRuler™		
Prestained Protein Ladder	Fermentas	11, 17, 24, 33, 40, 55, 72, 100, 130, 170
SeeBlue®Plus2		
Pre-Stained Standard	Invitrogen	4, 6, 16, 22, 36, 50, 64, 98, 148, 250

2.5 Puffer und Lösungen

10x PBS

2 g KCl
2 g KH_2PO_4
80 g NaCl
21,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$
oder 10,5 g Na_2HPO_4
A. dest. ad 1 l

Trypsin 5 l

500 ml 10 x PBS + 4,5 l A. dest.
0,25% (w/v) Trypsin
0,1% (w/v) EDTA pH 7,7 mit 1 M NaOH

10x RIPA Lysis Puffer

20 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5
60 ml 5 M NaCl
50 ml 10% SDS
30 ml A. dest.
20 g Natriumdesoxycholat
20 ml 100% NP-40
A. dest. ad 200 ml

1x RIPA Lysis Puffer

1 ml 10x RIPA
9 ml A. dest.
1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette

2x SDS-Gelladepuffer

0,25 M Tris/HCl pH 6,8
4% (w/v) SDS
20% Glycerol
2 M DTT
0,05% Bromphenolblau
in A. dest.

<u>Western-Blot Waschpuffer PBST</u>	1 x PBS 0,1% Tween 20
<u>Western-Blot Blockingpuffer</u>	5% (w/v) Milchpulver in PBST (Western-Blot Waschpuffer)
<u>4x Elektrodenpuffer pH 8,3</u>	0,1 M Tris 0,768 M Glycin in A. dest.
<u>Western-Blot Transferpuffer</u>	1 x Elektrodenpuffer pH 8,8 20% Methanol

2.6 Antikörper

2.6.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antigen	Charakteristika	Immunogen	Spezies	Handelsname	Bezugsquelle
GAPDH	mAK, IgG	GAPDH aus Kaninchen- Muskel	Maus	Mab 374	Chemicon
p53	pAK, IgG	synthetisches Phosphopeptid	Kaninchen	# 9284	Cell Signalling

2.6.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Merkmal	Spezies	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-(HRP) gekoppelt	Ziege	Cell Signalling
anti-Maus IgG, Peroxidase- (HRP) gekoppelt	Pferd	Cell Signalling

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Medien für die Zellkultur

Die Zellkulturmedien und -zusätze wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Gibco BRL und Seromed Biochrom KG bezogen.

MEM	95,7 g MEM in 9 l A. dest. lösen pH 7,0 mit 4 M NaOH 22 g NaHCO ₃ A. dest. ad 10 l
D-MEM	100,3 g D-MEM in 9 l A. dest. lösen pH 7,0 mit 4 M NaOH 37 g NaHCO ₃ A. dest. ad 10 l
McCoy's 5A	119,5 g McCoy's in 9 l A. dest. lösen pH 7,0 mit 4 M NaOH 22 g NaHCO ₃ A. dest. ad 10 l

RPMI-1640	103,9 g RPMI-1640 in 9 l A. dest. lösen pH 7,0 mit 4 M NaOH 20 g NaHCO ₃ A. dest. ad 10 l
α - MEM	100,8 g α -MEM in 9 l A. dest. lösen pH 7,0 mit 4 M NaOH 22 g NaHCO ₃ A. dest. ad 10 l

2.7.2 Zelllinien

A549

Diese humane Lungencarcinoma Zelllinie wurde in McCoy's 5A mit 10% (v/v) FKS (20 mM Hepes pH 6,85) kultiviert. Für Experimente wurden 1×10^6 Zellen in 100 mm Petrischalen gegeben und 48h kultiviert. Die Zellen wurden von J. E. Biaglow, Department of Radiology, Salt Lake City zur Verfügung gestellt.

AG1522

Menschliche, diploide Haut-Fibroblastenzelllinie. Die AG1522 Zellen wurden in α -modifizierten MEM mit 10% (v/v) FKS kultiviert. 48h vor Beginn der Experimente wurden 1×10^6 Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert. Diese Zelllinie wurde von J. Bedford, Department of Environmental and Radiological Health Sciences, Colorado zur Verfügung gestellt.

b-End

Maus-Endothelzelllinie, PymT-transformiert aus Gehirn-Mikrogefäßen (Montesano *et al.*, 1990), wurde von Prof. Dr. E. Winterhager, Institut für Anatomie am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt. Die b-End Zellen wurden in D-MEM +10% (v/v) FKS kultiviert. Für die Experimente wurden 48h vorher $0,5 \times 10^6$ Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert.

EA. hy 926

EA. hy 926 ist eine Hybridzelllinie, die durch Fusion von A549 Zellen und primären Endothelzellen entstanden ist. EA. hy 926 wuchsen in D-MEM versetzt mit 10% (v/v) FKS. 48h vor Experimentbeginn wurden 1×10^6 Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert. Die Zellen wurden von C.-J. S. Edgell, Pathology Department, North Carolina zur Verfügung gestellt.

Jeg3

Diese humane Chorionkarzinomzelllinie ist klonal aus BeWo Zellen (humane Chorionkarzinomzellen, ATCC CCL 98) entstanden und wurde von Prof. Dr. E. Winterhager, Institut für Anatomie am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt. Jeg3 Zellen wurden kultiviert in MEM mit 10% FKS. Für Experimente wurden 1×10^6 Zellen / 100mm Petrischale ausplattiert und für 48h kultiviert.

Jeg3 Cx43/102

Connexin Transfektanten (Cx43 und Cx26) der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 unter der Kontrolle eines tet-on Systems wurden von Prof. Dr. E. Winterhager, Institut für Anatomie am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt. Jeg3 Tet-Transfektanten wurden in MEM mit 10% (v/v) FKS und 500 µg/ml G418 Sulfat und 0,5 µg / Puromycin kultiviert. Um die Connexin Produktion zu induzieren, wurden die Transfektanten für 48h mit 1 µg/ml Doxzyklin HCl (Sigma) inkubiert. Diese Zellen wurden vor dem Experiment mit einer Zellzahl von 1×10^6 / 100 mm Petrischale ausplattiert und für 48h inkubiert.

T98G

T98G Zellen sind menschliche Glioblastoma Zellen mit einem mutierten *p53* (*mp53*) und einem Wildtyp *p53* (*wtp53*) Gen. T98G Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit 10% (v/v) FKS und 0,01% Natrium Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden von Dr. K. M. Prise, Mount Vernon Hospital, Northwood, Middlesex zur Verfügung gestellt. Für Experimente wurden je 1×10^6 Zellen in 100 mm Petrischalen ausplattiert und für 48h inkubiert.

A1-5 Klon 2

A1-5 Zellen sind Ratten-Embryofibroblasten, transfiziert mit mouse val 135 p53 plus EJ-ras. Diese p53 Maus Mutante ist temperatursensitiv und zeigt eine Hemmung des

Zellwachstums bei niedrigen Temperaturen. Der A1-5 Klon 2 stammt von A1-5 Zellen und wurde von Dr. Ya Wang, Department of Radiation Oncology, Philadelphia zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen in D-MEM mit 10% (v/v) HI FKS. 48h vor den Experimenten wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100 mm Petrischalen kultiviert.

2.7.3 Kultivierungsbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂/95% Luft in einem befeuchteten Brutschrank kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als Kultivierungsgefäße wurden 100 mm Petrischalen mit einer Grundfläche von 78,53 cm² verwendet. Die verwendeten Kulturmedien wurden durch Filtration sterilisiert, Glasflaschen bei 120°C und 1,2 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Zum Passagieren der Zellen in neue Petrischalen wurde alle 3 bzw. 4 Tage das Kulturmedium abgesaugt und der Zellmonolayer mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 5-10 minütige Inkubation der Zellen mit 0,25% Trypsin / 0,1% EDTA bei 37°C und 5% CO₂/95% Luft, um die Zellen vom Boden der Petrischale zu lösen (Trypsinierung). Nach Resuspension der Zellen im jeweiligen Kulturmedium wurden die Zellen in neue Petrischalen überführt. Die Induktion der Connexin-Expression in den Tet-Transfektanten Jeg3 Cx43/102 erfolgte durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxzyklin (Dox) ins Kulturmedium.

2.7.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen (nach M. J. Borrelli)

Exponentiell wachsende Zellmonolayer wurden trypsiniert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt und anschließend zweimal in 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer Konzentration von 2×10^6 in Einfrierlösung A aufgenommen, für 3-5 min auf Eis inkubiert und schließlich mit dem gleichen Volumen Einfrierlösung B 1:1 gemischt. 0,5 ml Aliquots der Zellsuspension mit einer Endkonzentration von 2×10^6 wurden auf je ein Kryogefäß (Greiner Bio-One) verteilt. Die Einfriergefäße wurden über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Die längerfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei -134°C.

Stamm -Lösung

KH ₂ PO ₄	5 mM
KOH	25 mM
NaCl	30 mM
L(+) Milchsäure	20 mM
Dextrose (D-Glucose)	5 mM
MgCl ₂	0,5 mM
Sorbitol	200 mM

Die Stamm-Lösung wurde über einen Membranfilter steril filtriert.

Einfrierlösung A

80% der Stamm-Lösung + 20% H₂O

Einfrierlösung B

80% der Stamm-Lösung + 20% DMSO

Zum schnellen Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß in einem 40-50°C warmen Wasserbad geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem Kulturmedium aufgenommen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 Upm, 5min, 4°C), um das DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und auf zwei 100 mm Petrischalen verteilt. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.7.5 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Z2 Coulter Particle Counter und Size Analyser

Die Lebendzellzahl wurde durch das Widerstandsmessverfahren (Coulter-Meßprinzip/US-Patent Nr. 2.656.508) bestimmt. Zur Zellzahlbestimmung wurden 500 µl der abgelösten Zellen in 9,5 ml Isoton II gegeben. Aus dieser Suspension wird eine definierte Menge durch eine Kapillaröffnung des Z2 Coulter Particle Counter und Size Analysers gezogen. Jede Zelle bewirkt beim Durchfließen der Messöffnung eine kurzfristige Erhöhung des

elektrischen Widerstandes. Die Summe der hieraus resultierenden elektrischen Impulse ergibt die genaue Zellzahl/ml.

2.8 Proteinchemische Methoden

2.8.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten aus Zellen

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen für die SDS-PAGE wurden diese nach dem Ablösen aus den Kulturschalen bzw. nach dem Sortieren mittels Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert und anschließend 1-2 mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellpellets je nach Größe in 50-500 µl 1x RIPA - Puffer (vgl. 2.5) resuspendiert und für einige Sekunden auf dem Vortex gemischt. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (3-5x für 15 sec) und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation der Lysate auf Eis wurden diese noch einmal auf dem Vortex vermischt und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, 4°C). Der proteinhaltige Überstand wurde danach vorsichtig abpipettiert, in Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinlysaten erfolgte mit Hilfe des *DC* Protein Assays (Bio-Rad) nach der Methode von Lowry (1951). Hierfür wurden jeweils 5 µl Proteinlysat in 200 µl H₂O pipettiert und anschließend mit 100 µl Reagenz A' (20 µl Reagenz S auf 1 ml Reagenz A) auf dem Vortex gemischt. Nach Zugabe von 800 µl Reagenz B wurden die Proben erneut auf dem Vortex gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Erhöhung des Absorptionsmaximums des entstandenen charakteristischen blauen Farbkomplexes wird bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer gemessen. Aus den Absorptionswerten der Proben wurden die Proteinkonzentrationen über die Geradengleichung einer Eichkurve ermittelt. Eine „neue“ Eichkurve wurde für jede Proteinbestimmung aus bekannten Konzentrationen von BSA (1,5 -15 µg/ml) erstellt.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Die 10% igen Polyacrylamidgele wurden mit einer konstanten Spannung von 100-130 V für 1-2h betrieben.

Gelkomponenten (Angaben für jeweils 10 ml):

Acrylamidlösung:	Acrylamid	30% (w/v)
	N.N-Bisacrylamid	0,8% (w/v)
Trenngel:	Acrylamid/Bisacrylamidlösung	3,3 ml
	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml
	10% (w/v) SDS	100 µl
	10% Ammoniumpersulfat	50 µl
	A. dest.	4,1 ml
Sammelgel:	Acrylamid/Bisacrylamidlösung	1,3 ml
	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 ml
	10% (w/v) SDS	100 µl
	10% Ammoniumpersulfat	50 µl
	A. dest.	6,1 ml

Durch Zugabe von TEMED (10 µl) wurde die Polymerisation eingeleitet.

Das zu trennende Proteingemisch, wurde mit dem gleichen Volumen SDS-Gelladepuffer gemischt und für 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese fand bei konstanter Stromstärke in einen Tris / Glycin-Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS) statt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes bei der SDS-PAGE wurde entweder der PageRuler™ Prestained Protein Marker der Firma Fermentas oder der SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Marker der Firma Invitrogen verwendet (vgl. 2.4).

2.8.4 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine nach dem Prinzip des Nassblottings in einer Protan 3 Kammer (Bio-Rad) für 1h bei 100V / 400 mA und 4°C auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach dem Blotten wurde die Transfereffizienz und die Integrität der Proteine durch Färbung des Gels mit Coomassie Blue (Färbelösung s.u.) überprüft. Die Färbung erfolgte über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Gelentfärbung erfolgte zunächst 5-10 min in 50% (v/v) Methanol und 7,5% (v/v) Essigsäure, woran sich eine mehrstündige Entfärbung in 5% Methanol (v/v) und 7,5% (v/v) Essigsäure anschloss.

Gel-Färbelösung	Coomassie brilliant Blue R250	0,1% (w/v)
	Trichloressigsäure	10% (w/v)
	Salicylsäure	10% (w/v)

2.8.5 Immundetektion von Proteinen

Vor der Detektion von Zielproteinen mit Antikörpern wurden die Blots eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blocking-Puffer inkubiert. Nach erfolgreichem Blockieren der Membranen wurden diese mit Primärantikörper in Blocking-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Entfernung der ungebundenen Antikörper erfolgte durch einen 10-minütigen Waschschrift, dem drei 5-minütige Waschschriffe mit PBST folgten. Die Inkubation mit dem Horseradish-Peroxidase-(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für weitere 1,5h bei Raumtemperatur. In Tabelle 3 sind die Verdünnungen der Primär- und zugehörigen Sekundärantikörper angegeben.

Nach erneutem Waschen der Blots (1x10 min; 3x5 min) wurden die Membranen für 5 min mit 1-2,5 ml ChemiGlow West-Lösung (Alpha Innotec) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung der Chemilumineszenz mit Hilfe des VersaDoc 5000 Imaging Systems (Bio-Rad).

Tabelle 3: Für die Immundetektion verwendete Primär- und Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen

Primär - AK	Hersteller	Primär – AK - Verdünnung	Sekundär - AK	Sekundär – AK - Verdünnung
p53(Ser15)	Cell Signalling	1:1000	rabbit-hrp	1:2000
GAPDH	Chemicon	1:100.000	mouse-hrp	1:2500

2.9 Bestrahlung der Zellkulturen

2.9.1 Bestrahlung mit Photonen

2.9.1.1 Röntgengerät

Die Bestrahlung der Zellen mit Photonen (Röntgenstrahlung) wurde bei Raumtemperatur in einer am Institut für Medizinische Strahlenbiologie üblichen Versuchsanordnung durchgeführt. Diese Anordnung ist in Abbildung 7 dargestellt.



Abb. 7: Darstellung der Versuchsanordnung zur Bestrahlung von Zellkulturen

Die Bestrahlung erfolgte an einem Industrie-Röntgengerät ISOVOLT 320 HS (Pantax-Seifert, Spezifikations-Nr.: 1.539.30.00.01) bei einer Spannung von 320 kV, einer Stromstärke von 10 mA und unter Verwendung eines 1,65 mm dicken Aluminiumfilters. Die Dosisleistung betrug 1,31 Gy/min. Der Abstand vom Fokus bis zur Oberfläche des Lagerungstisches betrug 75 cm, wobei sich die Zellen am Boden der Petrischalen ca. 2 mm oberhalb der Tischoberfläche befanden.

2.9.1.2 Dosimetrie der Bestrahlung mit Photonen

Die Dosisleistung und Dosisverteilung in der oben beschriebenen Versuchsanordnung wurden mit einem Universal Dosimeter UNIDOS E (PTW, Dr. Pynchau, Freiburg) bestimmt.

2.9.2 Bestrahlung mit Neutronen

2.9.2.1 Zyklotronanlage

Die Bestrahlung der Zellen mit Neutronen erfolgte am Neutronenbestrahlungsgerät der Zyklotronanlage CV 28 der Strahlenklinik des Universitätsklinikums Essen (Direktor: Prof. Dr. med. Stuschke). Beim Beschuss eines Berylliumtargets mit 14 MeV Deuteronen entsteht durch die Kernreaktion ${}^9\text{Be}(d,n){}^{10}\text{B}$ und die Abstreifreaktion $d \rightarrow (n+p)$ ein Neutronenspektrum mit einer mittleren Energie von ca. 5,8 MeV. Der Neutronenstrahl tritt vorwiegend in Vorwärtsrichtung zum einfallenden Deuteronenstrahl aus dem Berylliumtarget aus. Durch einen Kollimatoreinsatz kann die Feldgröße bestimmt werden.

2.9.2.2 Versuchsanordnung

Die Bestrahlung der Zellkulturen erfolgte in 100 mm Petrischalen mit einer Gesamthöhe, einschließlich Deckel, von 21 mm. Die Zellen befanden sich bei 10 ml Medium in einer Schichtdicke von 1,76 mm auf dem Boden der Petrischale.

Um eine möglichst große Anzahl von Petrischalen gleichzeitig zu bestrahlen, wurden drei Schalen zu einer Säule übereinander gestellt und vier Säulen im maximal größtmöglichen Feld von 21 cm x 21 cm, bezogen auf den Isozentrumsabstand 125 cm, angeordnet (vgl. Abb.8).

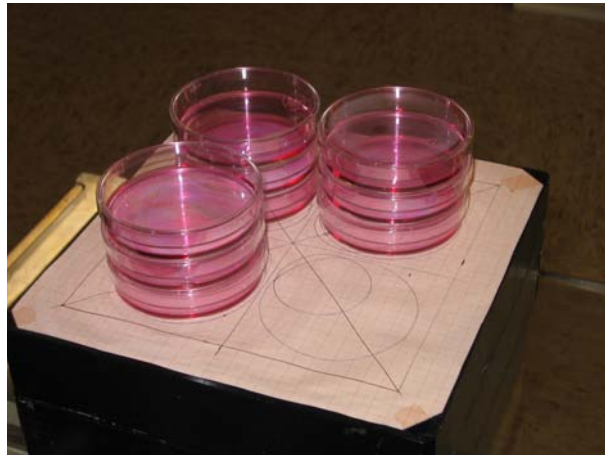


Abb. 8: Darstellung der Versuchsanordnung zur Bestrahlung von Zellkulturen im gewebeäquivalenten A150-Phantom

Ein gewebeäquivalentes Phantom aus Kunststoffplatten A150 mit den Kantenlängen 25 cm x 25 cm diente als Streumaterial zur Homogenisierung des Bestrahlungsfeldes. Abbildung 9 zeigt die gesamte Anordnung mit einer Bodenplatte als Rückstreukörper von 15 cm und einer Deckschicht von 2 cm Dicke.



Abb. 9: Versuchsaufbau mit gewebeäquivalentem A150 – Phantom zur Bestrahlung der Zellkulturen

2.9.2.3 Dosimetrische Untersuchungen zur Bestrahlung mit Neutronen

Allgemeines

Das Bestrahlungsfeld der Essener Neutronenanlage besteht aus den Teilkomponenten Neutronen und Photonen. Die Photonen entstehen einerseits im Target und Kollimator und andererseits im bestrahlten Volumen durch die Neutroneneinfangreaktion $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{d}$. Der Anteil der Photonenenergiedosis an der Gesamtenergiedosis liegt zwischen 8% und 12% und ist abhängig von der Feldgröße, von der Phantomtiefe und vom lateralen Abstand zum Zentralstrahl. Bei der Patientenbestrahlung findet die unterschiedliche Empfindlichkeit / Wirksamkeit zwischen Photonen und Neutronen auf unterschiedliche Gewebearten Ausdruck durch den Bewertungsfaktor q . Allgemein gilt:

$$D_{\text{eff}} = D_n + q \times D_\gamma$$

D_{eff} totale effektive Dosis,

D_n Neutronenenergiedosis,

q relative (biologisch) Wirksamkeit und

D_γ Photonenenergiedosis

Bei der Neutronenbestrahlung von Patienten wird für allgemeines Bindegewebe mit $q = 1/3$ gerechnet. Alle im Folgenden angegebenen Dosiswerte berücksichtigen diesen Faktor.

Messungen am Versuchsaufbau

Wie aus den Abbildungen 8 und 9 ersichtlich wird, weicht der Versuchsaufbau erheblich von einem allseitig umschlossenen, homogenen und unendlich großen Phantom ab. Aus diesem Grunde sind von den Mitarbeitern der Medizinischen Strahlenphysik Messungen durchgeführt worden, die eine Dosisbestimmung in den Zellschichten der unterschiedlichen „Layer“ innerhalb der Säulen ermöglichen. Dazu sind neben den Messungen mit einer Ionisationskammer (Gesamtenergiedosis) und einem Geiger-Müller-Zählrohr (Photonenenergiedosis) an unterschiedlichen Positionen im Versuchsaufbau auch im Vergleich dazu Messungen im homogenen, gewebeäquivalenten Phantom durchgeführt worden.

Die Messungen ergaben an Position „A₀“, vgl. Abb.10, einen Anteil der Photonenenergiedosis in der Ebene der mittleren Petrischale von 10,5% zur Gesamtenergiedosis.

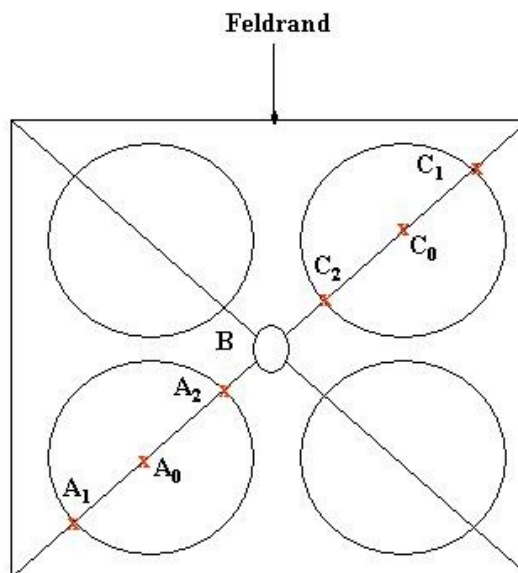


Abb. 10: Anordnung der Petrischalen im Bestrahlungsfeld

Zur Beurteilung der Inhomogenität auf dem Boden der Petrischalen durch den lateralen Dosisabfall wurden entlang der Felddiagonalen in den Punkten A₀ bis A₂, B und C₀ bis C₂ Messungen durchgeführt. Die Inhomogenität am Boden der Petrischalen zwischen den Punkten A₀ und A₁ sowie A₀ und A₂ belief sich auf etwa $\pm 2\%$. Gleiches gilt aus Gründen der Symmetrie für die anderen Schalen.

Eine Betrachtung der Unterschiede zwischen den Zellschichten der oberen bzw. unteren zur mittleren Ebene der Petrischalen nach dem quadratischen Abstandsgesetz zeigt eine Abweichung von jeweils ca. 3,3%. Um diesen Unterschied auszugleichen, wurde die Bestrahlung nach der Hälfte unterbrochen und die obere Schicht Petrischalen mit der unteren getauscht.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit der Energiedosis 3,3 Gy. Es wurden 2-5 unabhängige Experimente pro Versuchsansatz durchgeführt.

Mit Hilfe der am Versuchsaufbau gewonnenen Messwerte ließ sich eine Monitorkalibrierung für die applizierten Dosen von 3 Gy durchführen. Die Dosisangaben sind nach einer Eichung mit einem Kalorimeter mit einem prinzipiellen messtechnischen

Fehler von 3 bis 4% behaftet. Hinzu kommt der auf die Inhomogenität durch den Lateralabfall beruhende Fehler von etwa $\pm 2\%$.

2.10 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit einem FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) kann die relative Größe, Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim einzelnen Passieren einer Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Die Fluorochrome, mit denen die Zellen markiert wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Durch entsprechende Einstellungen am Gerät lässt sich gezielt eine gewünschte Subpopulation der aufgenommenen Zellen analysieren. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird, oder das Punktwolkendiagramm (*dot plot*), bei dem zwei Streugrößen bzw. Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden. Die Messungen erfolgten am Epics XL-MCL™ (Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Datenaufnahme und -analyse erfolgte mit EXPO™32 MultiComp Software Version 1.2 (Beckman Coulter).

2.11 Farbstoff-Transfer-Assay und FACS-Analyse zur quantitativen Ermittlung der Zellkopplung

Um den Grad der Kopplung über gap junction-Kanäle zu analysieren, wurde der *Parachute Assay* in modifizierter Form angewendet. Diese Methode basiert auf dem Transfer von Calcein aus gefärbten Donorzellen zu ungefärbten Akzeptorzellen. Die Membran ist permeabel für Calcein AM. Intrazellulär kommt es zu einer Spaltung von Calcein AM durch unspezifische Esterasen und es entsteht das polyanionische, grün fluoreszierende Calcein, welches nicht mehr membrangängig ist, sondern nur noch über gap junction-Kanäle ausgetauscht werden kann.

Mit Hilfe von fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie (FACS) kann der Übertritt des Calceins von den Donorzellen auf die Akzeptorzellen bestimmt werden.

48h vor dem Experiment wurden je nach Zelllinie $0,5 \times 10^6$ bzw. 1×10^6 Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert. Um die Donorzellen mit dem Farbstoff Calcein AM zu färben, wurden die Zellen trypsinisiert und in Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit dem Zellcounter bestimmt. 1×10^6 Zellen/ml wurden dann mit $1 \mu\text{M}$ Calcein AM Färbelösung (1 ml Medium + 1% FKS + $1 \mu\text{l}$ CalceinAM-Stammlösung) für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen mit Medium und 1% FKS gewaschen und zentrifugiert (5min, 1500 rpm, 4°C), bevor sie in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 2:1 auf die Donorzellen gegeben wurden. Die Akzeptorzellen wurden zur besseren Unterscheidung mit dem „membranständigen“, rot fluoreszierenden Farbstoff „Vybrant DiI cell-labelling solution“ gefärbt. Dazu wurden die Zellen direkt auf der 100 mm Petrischale mit $5 \mu\text{M}$ DiI-Färbelösung ($5 \mu\text{l}$ der DiI Stammlösung pro 1 ml Kulturmedium) für 1h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach der DiI-Färbung wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe der Calcein gefärbten Donorzellen im Verhältnis 2:1 wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume co-kultiviert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden im FACS-Gerät (Epics XL-MCL™, Beckman Coulter) mit Hilfe der Software EXPO™32 MultiComp Version 1.2 analysiert. Es wurden 2-5 unabhängige Experimente pro Versuchsansatz durchgeführt. Pro Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Donorzellen waren durch eine hohe Grün-Fluoreszenz im Calcein Kanal (FL-1) gekennzeichnet. Der *dot plot* der DiI gefärbten Akzeptorzellen wiesen eine starke rote Fluoreszenz im DiI Kanal (FL-2) auf. Eine Zellkopplung zwischen den beiden Populationen, also ein Fluss von Calcein von den Donor- zu den Akzeptorzellen, war am Shift der Akzeptorzell-Population in Richtung Grün-Fluoreszenz (FL-1) zu erkennen. Diese Zellen wurden im Dot-plot-Histogramm gelb dargestellt. Abbildung 11 zeigt die Dot-plot-Histogramme für Calcein gefärbte Zellen, DiI gefärbte Zellen, sowie das Histogramm von kommunizierenden Zellen. Die im Dot-plot-Histogramm violett dargestellten Zellen symbolisieren den Farbübertrag von den DiI gefärbten Zellen auf die Calcein gefärbten Zellen. Da es sich hierbei nicht um Kopplung zwischen den Zellen handelt, sind diese farblich von den koppelnden Zellen abgegrenzt und werden so auch nicht in die Berechnung des Kopplungsgrades einbezogen.

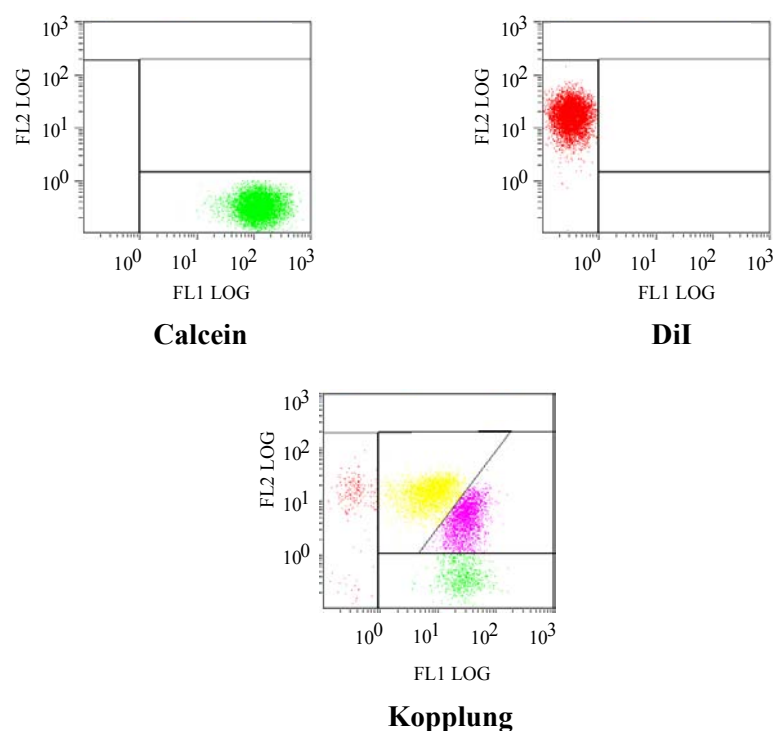


Abb. 11: Dot-plot-Histogramme der Zelllinie b-End. Die Kopplungszeit beträgt 4 h. Die Kopplungseffizienz liegt bei 97%. Die Donorzellen, die mit Calcein gefärbt wurden, sind durch eine hohe Grün-Fluoreszenz im FL-1 Kanal gekennzeichnet. Das Dot-plot-Histogramm ist dementsprechend in grün dargestellt. Der *dot plot* der DiI gefärbten Akzeptorzellen zeigt eine starke rote Fluoreszenz im FL-2 Kanal. Eine Zellkopplung zwischen den beiden Populationen wurde im Dot-plot-Histogramm gelb dargestellt. Die violetten Zellen symbolisieren den Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf Calcein gefärbte Zellen.

Da das Calcein-Emissionsspektrum mit dem des DiI-Spektrums überlappt, wird auch Calcein-Fluoreszenz im DiI-Kanal detektiert. Eine Mischung von Calcein gefärbten, DiI gefärbten und ungefärbten Zellen wurde eingesetzt, um den Signal-Nachweis zu optimieren und die Überlappung der Calcein-Fluoreszenz mit dem DiI Kanal zu kompensieren.

Der Grad der Kopplung konnte durch die Berechnung der Anzahl an kommunizierenden Akzeptorzellen (gelbe Zellen) im Verhältnis zur Gesamtzellzahl der Summe aus kommunizierenden Akzeptorzellen (gelbe Zellen) und nicht kommunizierenden Akzeptorzellen (rote Zellen) quantifiziert werden. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Kopplungsgrad in \%} = \frac{\text{gelbe Zellen}}{\text{gelbe Zellen} + \text{rote Zellen}} * 100$$

2.12 Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™

Die Zellsortierung erfolgte mit Hilfe des EPICS® Altra™ der Firma Beckman Coulter. Dieser Zellsorter ist ein Durchflusszytometer, der neben dem Zählen und Phänotypisieren einzelner Zellpopulationen eine gleichzeitige Trennung der Zellen aufgrund einer bestimmten Lichtstreuung oder ausgewählter Fluoreszenzeigenschaften, ermöglicht. Es wurden 2-4 unabhängige Experimente pro Versuchsansatz durchgeführt.

Mit Hilfe der Software EXPO™32 MultiComp Version 1.2 wurden die gewünschten Regionen für die zu trennenden Zellpopulationen festgelegt. Die Zellen einer verdünnten Messsuspension passieren eine Kanüle, werden durch einen Mantelstrom hydrodynamisch fokussiert und treten durch eine Düse (Durchmesser 50-100 µm), so dass sich ein freier Flüssigkeitsstrahl bildet. Die Zellen, die einzeln nacheinander durch die Foci mehrerer Laserstrahlen treten, können wie üblich in der Durchflusszytometrie durch die simultane Messung der Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung und seitlicher Richtung sowie - bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen - durch die Laser-induzierte Fluoreszenz nachgewiesen werden. Zur Sortierung einzelner Zellen wird der elektrisch leitfähige (Isoton II) Flüssigkeitsstrom durch eine piezoelektrische Modulation aufgebrochen. Das Tröpfchen, in dem sich eine Zelle mit ausgewählten Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften befindet, wird elektrisch geladen, in einem elektrostatischen Feld abgelenkt und in Reagenzröhrchen aufgefangen.

Abb. 12 A zeigt eine ungefärbte Population von b-End Zellen, die mit einer DiI gefärbten b-End Population für 4h co-kultiviert wurde. Abbildung 12 B und C zeigen die b-End Population nach der Auftrennung. Es sind zwei Populationen erkennbar, die durch das Definieren von „Gates“ (Schranten) näher charakterisiert werden können.

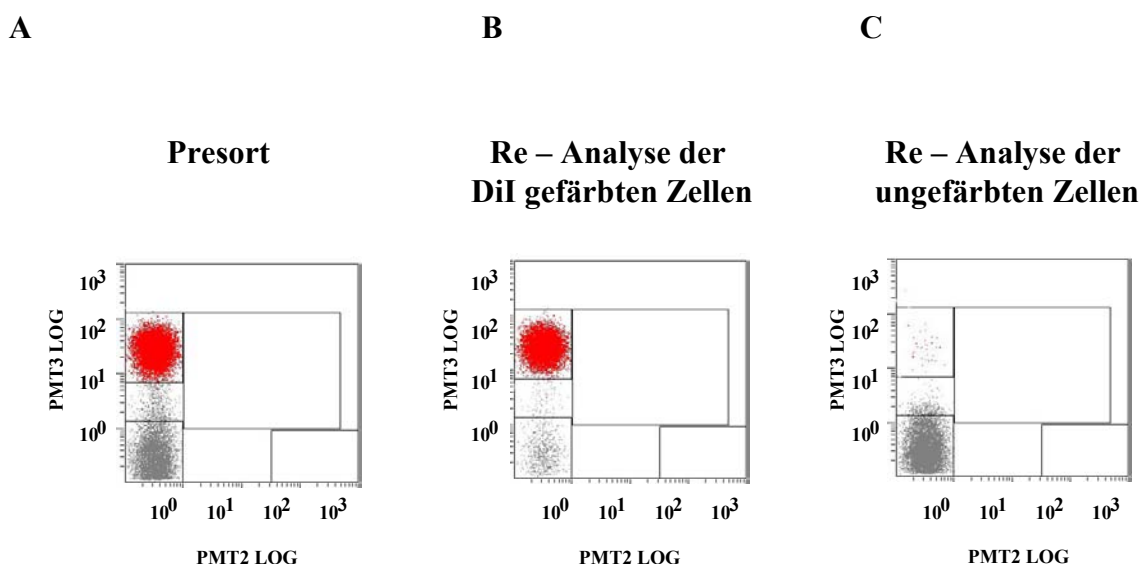


Abb. 12: Dot-plot-Histogramme der b-End. Zellen **A** vor dem Sortieren: Co-Kultur von ungefärbten b-End Zellen (grau) mit DiI gefärbten b-End Zellen (rot); Kopplungszeit 4h, **B** Re-Analyse der DiI gefärbten b-End Zellen nach der Zellsortierung, **C** Re-Analyse der ungefärbten b-End Zellen nach der Zellsortierung

Die Reinheit der Re-Analysen lag in den einzelnen Sortierungsexperimenten immer zwischen 97-99%.

2.13 Untersuchung von „bystander“-Effekten

Um „bystander“-Effekte zu untersuchen, wurden diese unbestrahlten mit bestrahlten Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte nach der Bestrahlung co-kultiviert. Die bestrahlten Zellen wurden zur besseren Unterscheidung mit dem „membranständigen“, rot fluoreszierenden Farbstoff „Vybrant DiI cell-labelling solution“ gefärbt. Dazu wurden die Zellen direkt auf der 100 mm Petrischale mit 5 μ M DiI-Färbelösung (5 ml der DiI Stocklösung pro 1 ml Kulturmedium) für 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der DiI-Färbung wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml frischem Medium wurden die Zellen entweder mit Photonen oder mit Neutronen (vgl. 2.9) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen trypsiniert, in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 2:1 auf die ungefärbten und nicht bestrahlten Zellen gegeben. Die Zellpopulationen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte co-kultiviert. Danach wurden die Zellen trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe des EPICS® Altra™ (Beckman Coulter) unter Verwendung der Software EXPO™32 MultiComp Version 1.2 sortiert. Es wurden 2-5 unabhängige Experimente pro Versuchsansatz durchgeführt.

2.14 Untersuchung des Zellzyklus

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung der Zellzyklusphase (G_1 , S, G_2) einer Zelle anhand des DNA-Gehaltes. So lässt sich innerhalb einer logarithmisch wachsenden Zellpopulation der Anteil der G_1 , S und G_2 Zellen bestimmen. Mit diesem methodischen Ansatz kann eine Analyse verschiedener exogener Einflussfaktoren auf den Zellzyklus erfolgen.

Nach dem Ablösen der Zellen wurde unter Vortexen kaltes 70%-iges Ethanol (1-3 ml) zu den Zellen hinzugefügt und über Nacht auf den Zellen belassen (4°C). Danach wurden die Zellen bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 1xPBS gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml PBS mit 62 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA und 40 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (PI) resuspendiert. Die Zellen wurden im Dunkeln entweder für 15 min bei 37°C oder für 1h bei RT inkubiert. Dabei erfolgt eine Interkalation von PI in die DNA. Die DNA und der interkalierende Farbstoff PI bilden einen stöchiometrischen Komplex. Dabei ist die aufgenommene Menge Farbstoff proportional zur DNA-Menge. Die PI-Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Epics XL-MCL™ Durchflusszytometers analysiert. Die Fluoreszenzintensität erlaubt Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt. Anhand der DNA-Menge kann bestimmt werden, um welche Zellzyklusphase es sich handelt. Zellaggregate fanden bei der Analyse keine Berücksichtigung.

Die Berechnung der % Anteile der G_1 , S und der G_2 Zellen erfolgte mit Hilfe der MultiCycle Software.

Puffer	10 mM Tris 100 mM EDTA 50 mM NaCl
PI-Stocklösung	4 mg/ml A. dest. 40 mg/10 ml A. dest. = 10 $\mu\text{l/ml}$ Probe = 40 $\mu\text{g/ml}$
RNaseA	10 mg/ml Puffer 62 mg/10 ml Puffer = 10 $\mu\text{l/ml}$ Probe = 62 $\mu\text{g/ml}$

2.15 Untersuchung von „bystander“-Effekten mit Hilfe des „transwell insert coculture system“

Ein weiteres System, das verwendet wurde, um „bystander“-Effekte in nicht direkt bestrahlten Zellen zu untersuchen, war das „transwell insert coculture system“ (Becton Dickinson). In diesem Versuchsansatz wurden die bestrahlten Zellen von den unbestrahlten Zellen durch ein permeables Membransystem voneinander getrennt. Die Zellen werden im selben Medium inkubiert, sind aber physikalisch durch die Membran getrennt. Abbildung 13 zeigt den schematischen Versuchsaufbau.

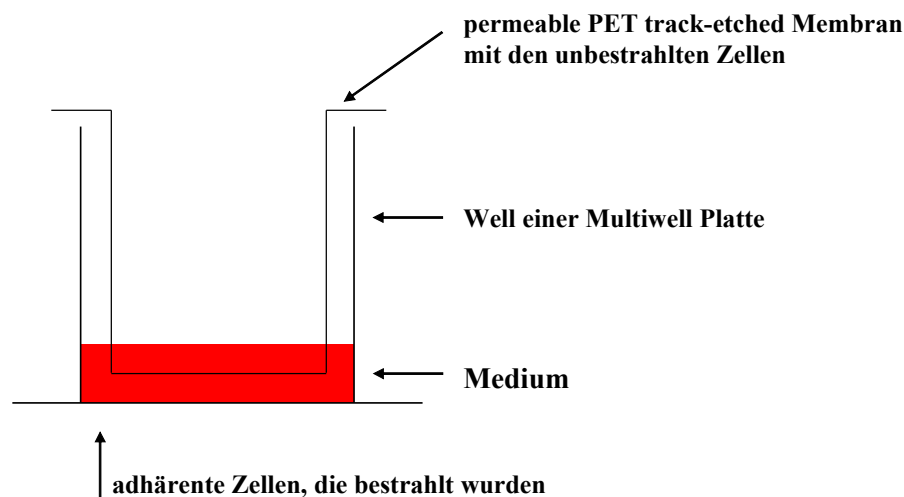


Abb. 13: „transwell insert coculture system“ von Becton Dickinson. Die Zellen auf der Multiwell Platte wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. Die unbestrahlten Zellen befanden sich auf den Inserts mit der permeablen Membran und wurden direkt nach der Bestrahlung auf die bestrahlten Zellen gesetzt. Die Co-Kultivierung erfolgte für 1 h bzw. 8 h. Anschließend wurden die beiden Zellpopulationen wieder voneinander getrennt, indem die Inserts aus den Wells genommen wurden.

24h vor dem Experiment wurden $0,15 \times 10^6$ b-End Zellen sowohl auf die 12 Wells der Mutiwell Platte (Becton Dickinson), als auch auf die Inserts mit der permeablen PET track-etched Membrane (Becton Dickinson) ausplattiert. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen auf der Multiwell Platte mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (vgl. 2.9.1). Anschließend wurden die Inserts mit den unbestrahlten Zellen in die Wells gesetzt. Die

Co-Kultivierung der beiden Zellpopulationen erfolgte für 1h bzw. 8h bei 37°C und 5% CO₂. Der Boden der Inserts besteht aus einer permeablen PET track-etched Membran mit einer Porengröße von 1 µm bei einer Dichte von 1,6 x10⁶/cm². Der Abstand von der Membran am Boden der Inserts zum Boden der Multiwell Platte betrug 0,9 mm.

2.16 Nachweis von Mikronuklei in binukleären b-End Zellen

2.16.1 Cytochalasin B-Zugabe

24h nach Kulturbeginn wurden die Zellen bestrahlt (vgl. 2.9.1). Direkt im Anschluß erfolgte die Zugabe von Cytochalasin B (nach dem Standardprotokoll von Fenech und Morley, 1985 a, b).

2.16.2 KCl-Behandlung

72h nach der Cytochalasin B-Zugabe wurden die b-End Kulturen trypsiniert. Anschließend wurde das Medium 5 min bei 1500 U/min abzentrifugiert und das Zellpellet unter langsamem, ständigem, sanftem Mischen in KCl Lösung aufgenommen. Der optimale Grad der Hypotonie der KCl Lösung, der eine ausreichende Schwellung der Zellen bewirkte, das Cytoplasma aber erhielt, änderte sich zeitweise und lag im Bereich zwischen 0,125 M und 0,18 M. Die KCl Lösung wurde sofort wieder abzentrifugiert.

2.16.3 Fixierung der b-End Zellen

Nach der KCl-Behandlung wurden die Zellen vorsichtig in frisch hergestelltem Fixativ (nach Wuttke *et al.*, 1993, Methanol: Essigsäure = 3:1; erst kurz vor Gebrauch mischen) aufgenommen und sofort zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig bis auf einen kleinen Rest abdekantiert und die Zellen in dem verbleibenden Fixativ resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Pasteurpipette auf in Ethanol entfettete Objektträger aufgetropft. Der Objektträger wurde sofort auf eine 45°C warme Heizplatte gelegt, um das restliche Fixativ zu entfernen.

2.16.4 Färbung und Auswertung der Mikronuklei beim Mikronukleustest

Die trockenen Präparate (mindestens 24h an der Luft getrocknet) wurden mit Acridinorange gefärbt. Die DNA erscheint dann grün und die RNA orange-rot. Aus einer 0,1% Acridinorange Stammlösung in Aqua dest. wird mit Sörensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) eine frische 0,01% Acridinorange Lösung hergestellt. Die Färbung der Zellen erfolgte für 3 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen für 2x 2 min in Phosphatpuffer (pH = 6,0) gewaschen. In den gefärbten Präparaten wurden die Mikronuklei bei 400 facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Es wurde angestrebt, 1000 binukleäre Zellen pro Probe auszuzählen.

Acridinorange Lösung:

Stammlösung: 0,1% in Aqua dest.

Färbelösung: 0,01% in Sörensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)

Sörensen-Phosphatpuffer (pH 6,0):

Lösung A = 1/15 M KH_2PO_4

Lösung B = 1/15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

85,2 ml Lösung B + 14,8 ml Lösung A

2.17 Software

Tabelle 4: Verwendete Software

EXPOTM32 MultiComp; Version 1.2 für Epics XL-MCLTM und Zellsorter Coulter^R Epics^A AltraTM (Beckman Coulter)

MultiCycle for Windows; Version 4.0 zur Analyse von DNA-Histogrammen (Phoenix Flow Systems)

Quantity One; Version 4.2 für Versa Doc Imaging System Modell 5000 (Bio-Rad)

UV Probe Software; Version 1.11 UV-2401 PC Spektralphotometer (Shimadzu)

3 Ergebnisse

3.1 Experimente zu den Eigenschaften der Farbstoffe

3.1.1 Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI

3.1.1.1 Der Fluoreszenzfarbstoff DiI

Ein Hauptziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Co-Kultivierungsexperimenten, bei denen die „bystander“ Reaktion in unbestrahlten Zellen untersucht werden kann. Die bestrahlten und unbestrahlten Zellen sollen nach der entsprechenden Co-Kultivierungszeit durch fluoreszenz-aktiviertes Zellsorting wieder voneinander getrennt und auf Strahlenschäden untersucht werden. Damit die Zellkulturen durch „FACS“ getrennt werden können, ist es notwendig, eine der beiden Zellpopulationen mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Der Farbstoff sollte stabil färben und nicht toxisch auf die Zellen wirken. Daher wurde für die folgenden Experimente der Fluoreszenzfarbstoff DiI (MoBiTec) ausgewählt. Im folgenden werden die Eigenschaften dieses Farbstoffes näher beschrieben.

3.1.1.2 Mechanismus der DiI-Färbung

Der Farbstoff Dialkylcarbocyanin 2-[3-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-ylidin)-1 propenyl]-3,3-dimethyl-1-octadecyl-perchlorat (DiI) ist ein lipophiler Farbstoff, der rot fluoresziert und dauerhaft die Zellmembran färbt. Carbocyanine zählen zu den am stärksten absorbierenden Farbstoffen und haben sich in verschiedenen Forschungsbereichen als nützlich erwiesen (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition). Obwohl DiI zu keiner der fünf natürlich vorkommenden Lipidklassen: Phospholipide, Sphingolipide, Fettsäuren, Triglyceride oder Steroide gehört, zeigt der Farbstoff strukturelle Ähnlichkeiten zu den auf Fettsäuren basierenden Lipiden und kann daher verwendet werden, um Zellmembranen zu markieren. Das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes hängt vom Membranpotential und der Zellgröße ab. Abbildung 14 zeigt die chemische Struktur von DiI (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition).

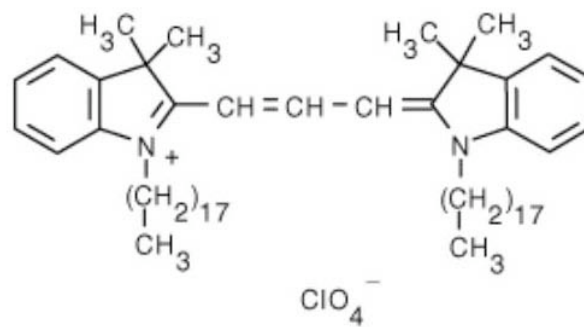


Abb. 14: chemische Struktur von Dialkylcarbocyanin 2-[3-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-ylidin)-1 propenyl]-3,3-dimethyl-1-octadecyl-perchlorat (DiI)

(aus: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition)

DiI ist ein amphiphiles Molekül. Der geladene Fluorophor ist an der Membranoberfläche lokalisiert, während der lipophile aliphatische Teil in der Zellmembran verankert ist (Abbildung 15).

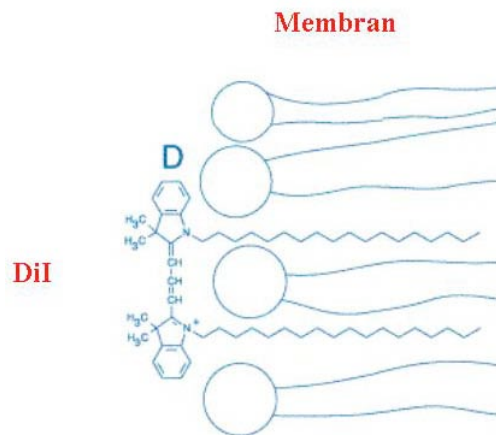


Abb. 15: Lokalisation und Orientierung des Fluoreszenzfarbstoffes in der Phospholipid Membran (aus: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition)

Zwar zeigt DiI keinen Einfluss auf das Zellüberleben oder andere grundlegende physiologische Prozesse, dennoch muss der Effekt von DiI für jede Zelllinie und jeden Endpunkt individuell getestet werden.

Das Absorptions- und Emissionsspektrum von DiI ist in Abbildung 16 zusammenfassend dargestellt.

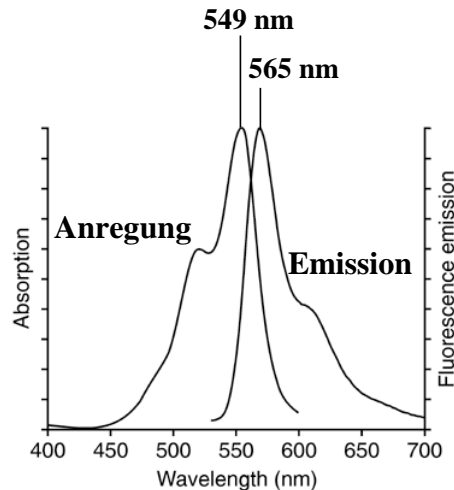


Abb. 16: Absorptions- und Emissionsspektrum von DiI (aus: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition)

In den folgenden Experimenten wurde DiI mit einem Argon Laser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert, angeregt.

Die Zellmembran von lebenden Zellen repräsentiert einen wichtigen Bereich für die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Frühe Arbeiten demonstrieren, dass Zellen relativ hohe Konzentrationen solcher lipophilen Farbstoffe tolerieren und die laterale Diffusion dieser Farbstoffe innerhalb der Membran zu einer einheitlichen Färbung der gesamten Zelle führt (Jyoti Dhar Malhotra 1998).

DiI ist ein stabiler Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner geringen Toxizität besonders für die Langzeit Markierung von Zellen geeignet ist.

Die Zelllinien b-End (Montesano *et al.*, 1990) und Jeg3 (ATCC HTB-36; Kohler und Bridson, 1971) wurden verwendet, um die Eigenschaften von DiI zu untersuchen und die Färbebedingungen zu optimieren. Diese beiden Zelllinien wurden später eingesetzt, um die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Induktion von „bystander“-Effekten zu untersuchen. Um die Versuchsbedingungen zu optimieren, wurden die folgenden Parameter untersucht: 1) Einfluss des Zustands der Zellen während der Färbung, z.B. adhären oder in Suspension; 2) Inkubationszeit; 3) Toxizität; 4) Stabilität der Färbung. Wie sich in späteren Experimenten herausstellte, übertragen DiI gefärbte Zellen den Farbstoff in gewissem Ausmaß auf ungefärbte Zellen während der Co-Kultivierung. Der Verlauf dieses Prozesses wurde daher eingehender untersucht. Die Ergebnisse sind im folgenden zusammengestellt.

3.1.1.3 Färbung: adhärenent oder in Suspension?

Zunächst einmal sollte untersucht werden, ob sich die Zellen besser adhärenent oder in Suspension mit DiI färben lassen. Zu diesem Zweck wurden $0,5 \times 10^6$ b-End / 100 mm Petrischale und 1×10^6 Jeg3 / 100 mm Petrischale ausplattiert (vgl. 2.7.2). Vor Beginn der Experimente wurden von jeder Zelllinie die Zellen einer Petrischale abgelöst und die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.7.5). Üblicherweise waren 48h nach dem Ausplattieren $2,2 \times 10^6$ b-End Zellen und $3,9 \times 10^6$ Jeg3 Zellen in einer Petrischale.

Für das eigentliche Experiment wurden zwei Ansätze hergestellt. In dem ersten Ansatz wurden die Zellen adhärenent mit $5 \mu\text{M}$ DiI (vgl. 2.11) gefärbt. Die Färbung erfolgte für 1h bei 37°C und 5% CO_2 . Anschließend wurden die Zellen zweimal in 1xPBS gewaschen, trypsinisiert und in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Analyse im Flow Cytometer (vgl. 2.10). In dem zweiten Ansatz wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und anschließend in Suspension, wie oben beschrieben, gefärbt. Direkt nach der Färbung wurden auch diese Zellen im Flow Cytometer untersucht. Abbildung 17 fasst die Daten zusammen. Dabei ist der Zustand der Zellen (adhärenent oder Suspension) gegen die mittlere Fluoreszenzintensität des DiI aufgetragen.

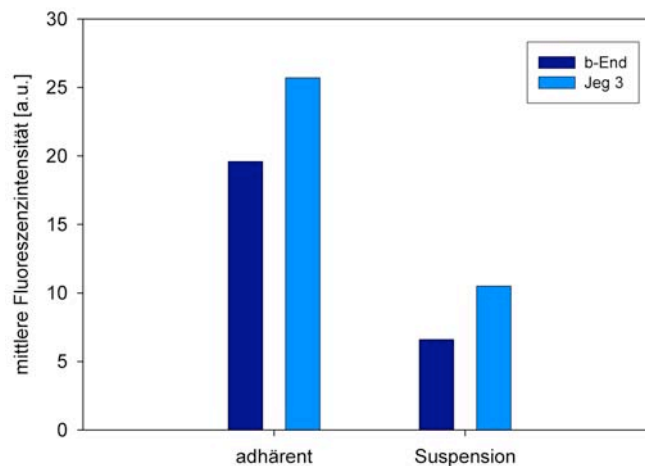


Abb. 17: Mittlere Fluoreszenzintensität bei DiI gefärbten b-End und Jeg3 Zellen. Entweder wurden die Zellen adhärenent mit $1 \mu\text{M}$ DiI gefärbt oder die Zellen wurden zunächst trypsinisiert und anschließend in Suspension mit $1 \mu\text{M}$ DiI gefärbt.

Adhärenent gefärbte b-End Zellen weisen eine dreifach höhere Zunahme der Fluoreszenzintensität des DiI im Vergleich zu den in Suspension gefärbten Zellen auf. Ferner ist die Färbung homogener als bei den in Suspension gefärbten Zellen. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Versuche mit den Jeg3 Zellen. Hier steigt die mittlere

Fluoreszenzintensität der adhärenz gefärbten Zellen um den Faktor 2,5 im Vergleich zu den Suspensionszellen. Diese Ergebnisse führen dazu, die Zellen im weiteren Verlauf dieser Arbeit adhärenz zu färben.

3.1.1.4 Kinetik der DiI Färbung

Um die Kinetik der DiI Färbung zu untersuchen, wurden $0,5 \times 10^6$ b-End Zellen/100 mm Petrischalen und 1×10^6 Jeg3 Zellen/100 mm Petrischalen ausplattiert (vgl. 2.7.2). Die Zellen wurden adhärenz mit $5 \mu\text{M}$ DiI gefärbt. Die Intensität der Färbung wurde nach 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 16h und 24h mit Hilfe des Flow Cytometers ausgewertet. Die Ergebnisse für die b-End und Jeg3 Zellen sind in Abbildung 18 dargestellt.

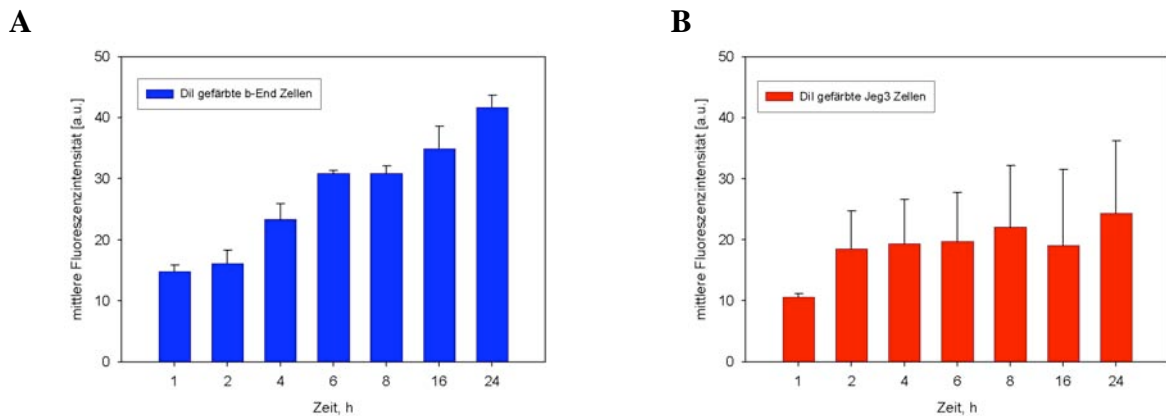


Abb. 18: mittlere Fluoreszenzintensität der DiI Färbung in Abhängigkeit von der Zeit. A

mittlere Fluoreszenzintensität von DiI gefärbten b-End Zellen im Verlauf der Zeit, **B**

mittlere Fluoreszenzintensität von DiI gefärbten Jeg3 Zellen im Verlauf der Zeit. Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen \pm SD.

In Abbildung 18 sind die Fluoreszenzintensitäten der DiI Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Bei den b-End Zellen nimmt die Fluoreszenzintensität in den ersten 6h zu, wobei in den ersten zwei Stunden der Unterschied sehr gering ist, und erreicht dann ein Plateau. Erst nach 24h kommt es zu einer erneuten Zunahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 18 A). Die Jeg3 Zellen zeigen dagegen nur eine sehr geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit. Bereits nach 2h ist hier ein Plateau erreicht (Abb. 18 B). Für beide Zelllinien gilt, dass die Färbung mit zunehmender Zeit homogener wird.

3.1.1.5 Toxizität der DiI Färbung

Ein weiterer Parameter, der untersucht wurde, war die Toxizität des DiI. Dazu wurden $0,1 \times 10^6$ b-End bzw. Jeg3 Zellen auf 60 mm Petrischalen ausplattiert und für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen mit 10 µM DiI in 3 ml Medium gefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 24h, 48h, 72h und 144h weiter inkubiert. Die Zellen, welche als Kontrollen dienten wurden unter gleichen Bedingungen behandelt, ohne sie mit DiI zu färben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und in 2 ml Medium resuspendiert. Die Messung der DiI Färbung erfolgte am Flow Cytometer (vgl. 2.10). Parallel dazu wurden die Zellzahlen bestimmt (vgl. 2.7.5). Die dadurch erhaltene Wachstumskurve ist in Abbildung 19 dargestellt.

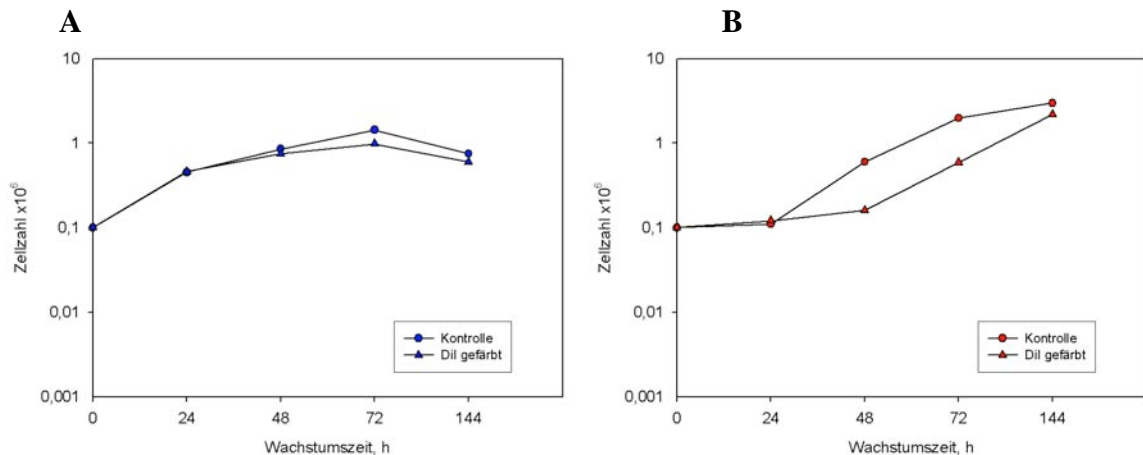


Abb. 19: A Wachstumskurve der b-End Zellen: die ungefärbten b-End Zellen (blauer Punkt)

dienen als Kontrollpopulation zu den DiI gefärbten b-End Zellen (blaues Dreieck), beide Ansätze wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet. Um die Wachstumskurve zu erstellen, wurde alle 24h die Zellzahl gemessen. **B Wachstumskurve der Jeg3 Zellen:** sowohl ungefärbte Jeg3 Zellen (roter Punkt) als auch DiI gefärbte Jeg3 Zellen (rotes Dreieck) wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet. Um die Wachstumskurve zu erstellen, wurde alle 24h die Zellzahl gemessen.

Das Wachstum der beiden Zelllinien wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet. Die b-End Zellen zeigen keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Kontrollen und den DiI gefärbten Zellen, obwohl die DiI gefärbten Zellen nach 48h einen leichten Rückgang in der Zellzahl zeigen (Abb. 19 A). Bei den Jeg3 Zellen dagegen induziert DiI schon nach 48h eine unmittelbare Inhibition des Wachstums. Nach dieser

Anpassung verdoppeln sich die gefärbten Zellen genauso wie die unbehandelten Zellen (Abb. 19 B).

In Abbildung 20 sind die Fluoreszenzintensitäten der DiI Färbung zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

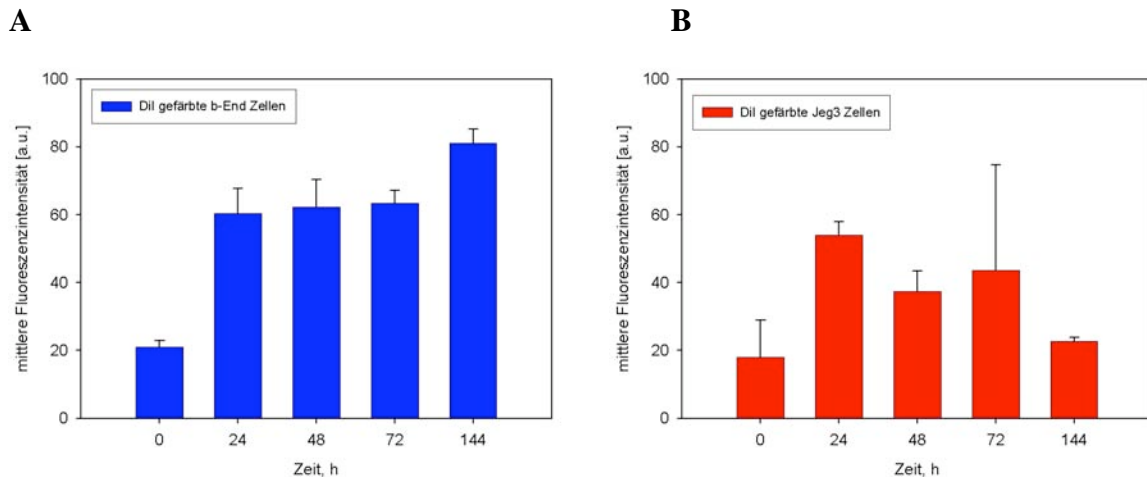


Abb. 20: A mittlere Fluoreszenzintensität der DiI Färbung in Abhängigkeit von der Zeit bei b-End Zellen; B mittlere Fluoreszenzintensität des DiI bei Jeg3 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Bereits 24h nach Beginn der Färbung der b-End Zellen mit DiI, zeigen die Zellen eine dreifache Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (Abb. 20 A). Die mittlere Fluoreszenzintensität des DiI bleibt dann jedoch bis zu 72h nach Beginn der Färbung konstant. Erst 144h nach Versuchsbeginn kommt es zu einem erneuten Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität.

Die Jeg3 Zellen zeigen zu Beginn des Experimentes einen ähnlichen Verlauf wie die b-End Zellen (Abb. 20 B). Auch die Zelllinie Jeg3 zeigt 24h nach Beginn der Färbung mit DiI eine dreifache Zunahme in der mittleren Fluoreszenzintensität des DiI. Jedoch kommt es bei den Jeg3 Zellen im Gegensatz zu den b-End Zellen, bereits 48h nach Versuchsbeginn wieder zu einer Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität. Dieser Rückgang setzt sich weiter fort, bis die mittlere Fluoreszenzintensität des DiI nach 144h wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt ist. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität könnte damit erklärt werden, dass das Verhältnis zwischen der DiI Konzentration und der Zellzahl abnimmt. Die Konzentration des DiI bleibt zwar gleich, aber die Zellzahl der Jeg3 Zellen steigt mit der Zeit an (vgl. Wachstumskurve Abb. 19 B), so dass für die Zellen nicht mehr genug Farbstoff zu Verfügung steht.

3.1.1.6 Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf ungefärbte Zellen

Für die Co-Kultivierungsexperimente ist es nötig, eine Zellpopulation mit DiI zu färben und mit einer ungefärbten Population für längere Zeit zu kultivieren. Damit die Zellpopulationen anschließend wieder voneinander getrennt werden können, muss gewährleistet sein, dass die Färbung mit DiI über einen gewissen Zeitraum relativ stabil bleibt. Ferner muss sichergestellt sein, dass die DiI gefärbten Zellen den Farbstoff nicht auf ungefärbte Zellen übertragen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden ungefärbte b-End Zellen zu adhären b-End Zellen, die für 4h mit DiI gefärbt wurden, gegeben und für verschiedene Zeitpunkte co-kultiviert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

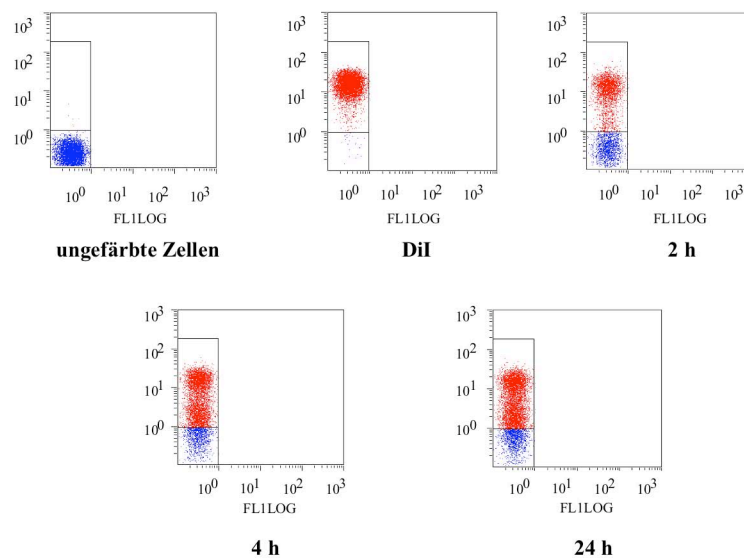


Abb. 21: Dot-plot-Histogramme von b-End Zellen: die adhären b-End Zellen wurden für 4h mit 5 μ M DiI gefärbt und für die gezeigten Zeitpunkte mit ungefärbten b-End Zellen co-kultiviert

Die ungefärbten b-End Zellen nehmen den Farbstoff als Funktion der Zeit auf. Das ist daran erkennbar, dass die ungefärbten Zellen (blaue Punkte im Dot-plot-Histogramm) im Dot-plot-Histogramm nach oben wandern und sich mit den DiI gefärbten Zellen (rote Punkte im Dot-plot-Histogramm) vermischen. Eine eindeutige Trennung der ungefärbten und der DiI gefärbten Population ist bereits nach 4h Co-Kultur nicht mehr möglich. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass der Farbstoff DiI nicht vollständig in die Zellmembran eingebaut wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das umgekehrte Experiment durchgeführt. Hierbei wurden die gefärbten Zellen trypsiniert und umgehend auf die ungefärbten Zellen gegeben. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse.

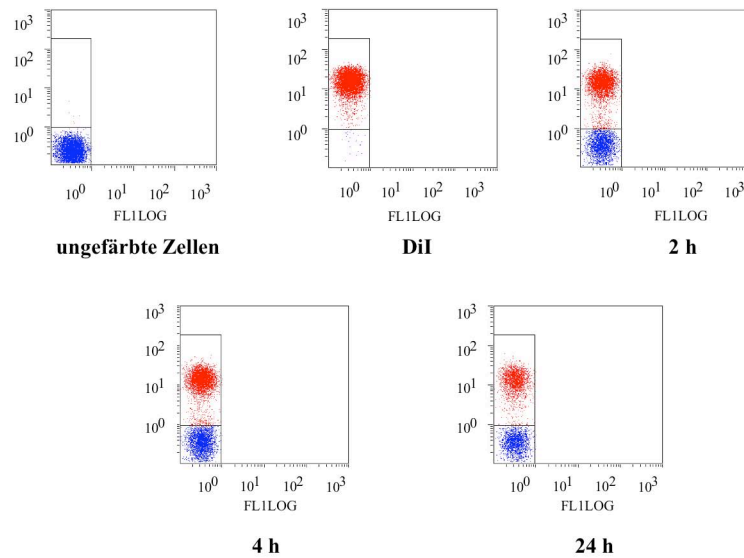


Abb. 22: Dot-plot-Histogramme von b-End Zellen: die b-End Zellen wurden für 4h mit 5 μ M DiI gefärbt, trypsiniert und für die gezeigten Zeitpunkte mit ungefärbten b-End Zellen co-kultiviert

Wenn man die DiI gefärbten Zellen trypsiniert und anschließend auf ungefärbte Zellen gibt, dann ist der Farbübertrag wesentlich geringer. Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass der ungebundene Farbstoff durch das Trypsinieren entfernt wird. Dieses Ergebnis führte dazu, dass in den Co-Kultivierungsexperimenten die DiI gefärbten Zellen trypsiniert und zu den ungefärbten Zellen gegeben werden müssen.

In weiterführenden Experimenten wurde getestet, ob die Färbedauer Einfluss auf den Farbübertrag hat. Dazu wurden die Zellen für 4h und 24h mit 5 μ M DiI gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen trypsiniert und sofort auf ungefärbte Zellen gegeben. Diese Kulturen aus gefärbten und ungefärbten Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte co-kultiviert und anschließend am Flow Cytometer analysiert. Abbildung 23 fasst die Ergebnisse für die b-End Zellen zusammen.

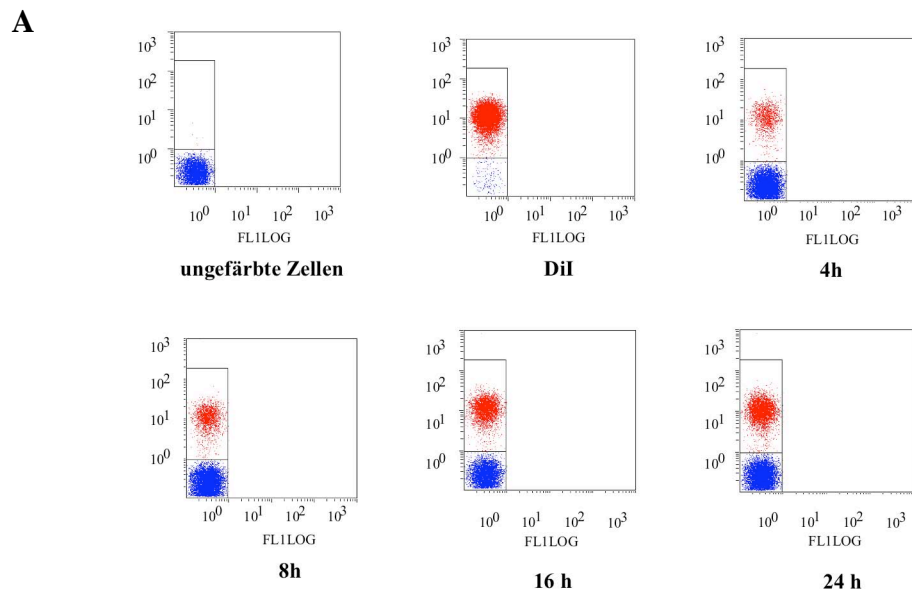


Abb. 23 A: b-End Zellen für 4h mit 5 μ M DiI gefärbt, trypsiniert und für die gezeigten Zeitpunkte mit ungefärbten b-End Zellen co-kultiviert

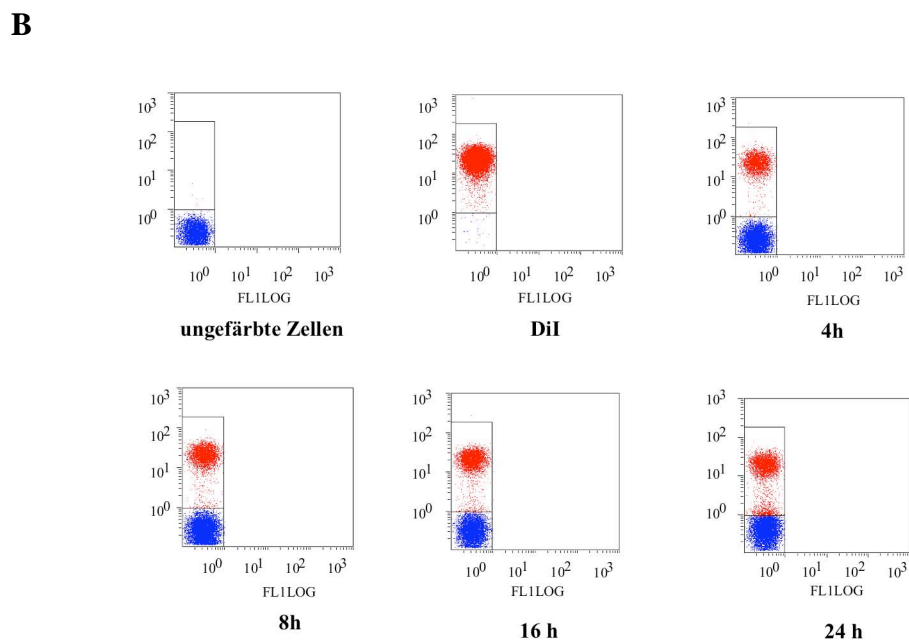


Abb. 23 B: b-End Zellen für 24h mit 5 μ M DiI gefärbt, trypsiniert und für die gezeigten Zeitpunkte mit ungefärbten b-End Zellen co-kultiviert

Wenn die Zellen für 24h mit DiI gefärbt werden, wird zwar mehr Farbstoff in der Membran gebunden und die Fluoreszenzintensität des DiI ist höher, aber der Farbübertrag

ist nicht höher als bei einer vierstündigen Färbung mit DiI. Das führte zu der Annahme, dass der entscheidende Parameter für den Farbübertrag die Trypsinierung der Zellen ist.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse für die Zelllinie Jeg3 dargestellt. In diesem Fall ist der Farbübertrag etwas geringer, wenn die Zellen 24h mit DiI gefärbt wurden.

A

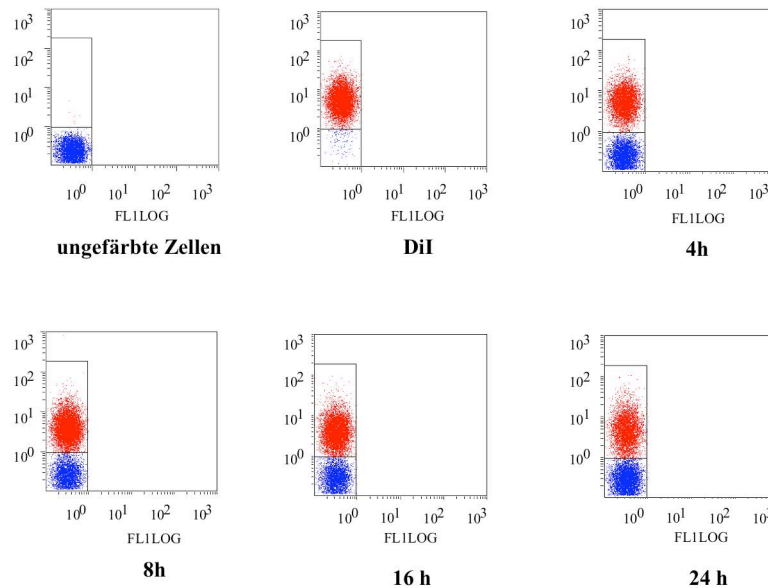


Abb. 24 A: Jeg3 Zellen für 4h mit 5 μ M DiI gefärbt, trypsinisiert und für die gezeigten Zeitpunkte mit ungefärbten Jeg3 Zellen co-kultiviert

B

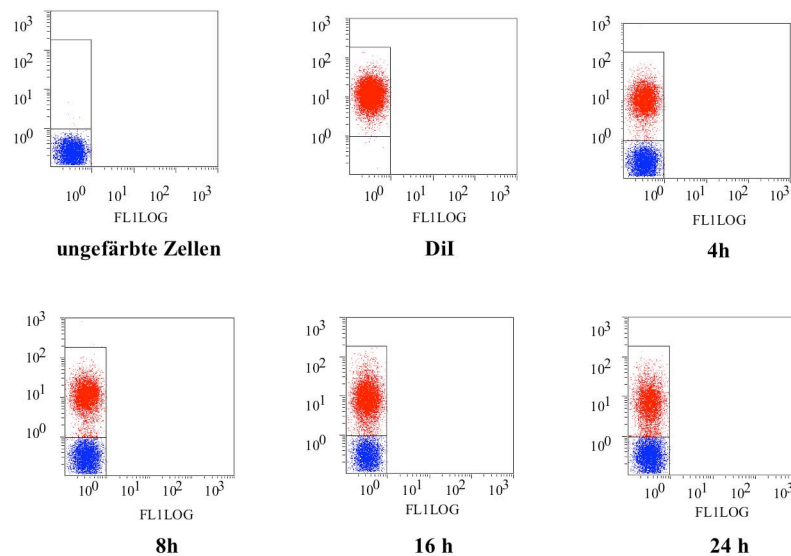


Abb. 24 B: Jeg3 Zellen für 24h mit 5 μ M DiI gefärbt, trypsinisiert und für die gezeigten Zeitpunkte mit ungefärbten Jeg3 Zellen co-kultiviert

3.1.1.7 Alternative Farbstoffe zu DiI: Färbung mit verschiedenen DiI Derivaten

Da es bei der Färbung der Zellen mit DiI zu einem Farbübertrag kam, sollte überprüft werden, ob es alternative Möglichkeiten gibt, die Zellen zu färben. Dazu wurden die DiI Derivate CM-DiI und SP-DiI (MoBiTec) in verschiedenen Zelllinien getestet. In den Abbildungen 25 und 26 sind die Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien in Form von Dot-plot-Histogrammen zusammen gestellt.

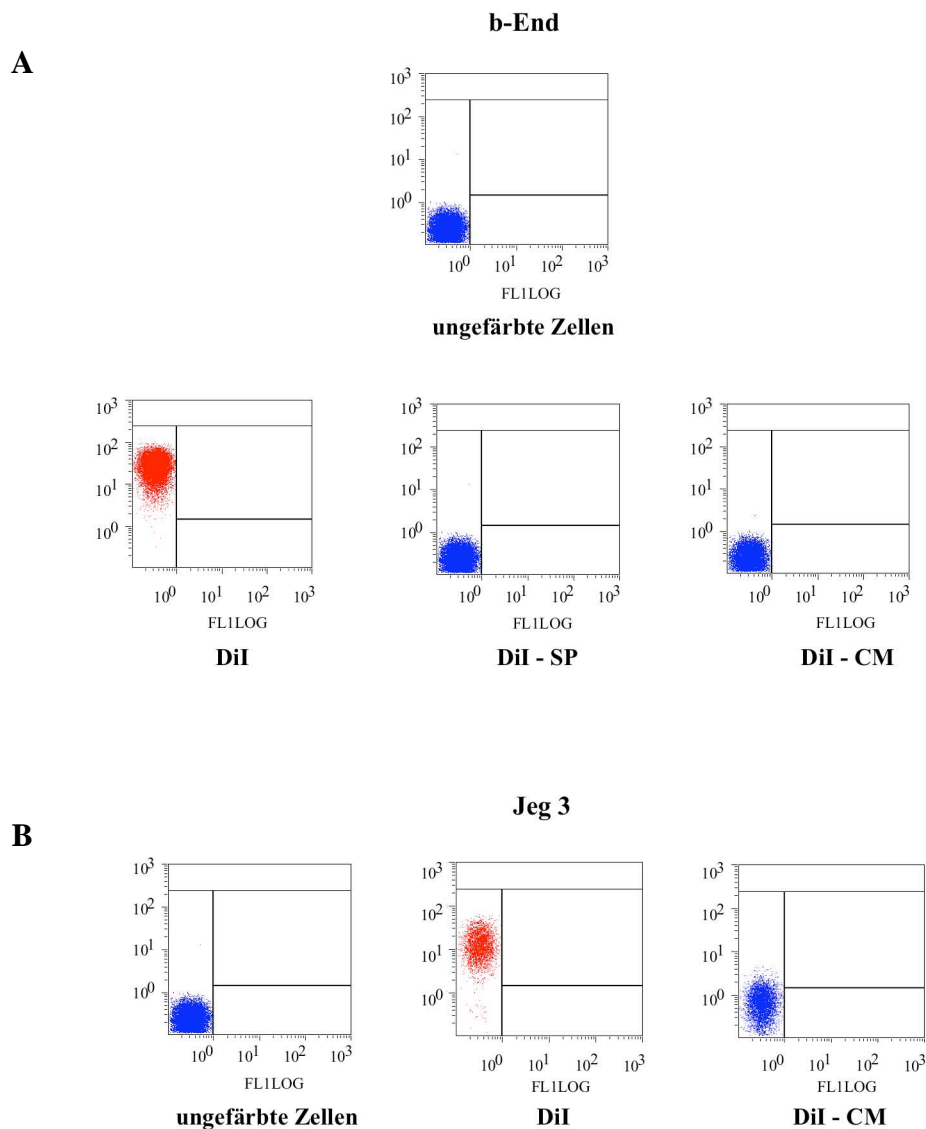


Abb.25: Dot-plot-Darstellung der DiI Färbung für verschiedene Zelllinien **A** ungefärbte b-End

Zellen als Kontrolle zu den mit DiI und den DiI Derivaten DiI-SP und DiI-CM gefärbten b-End Zellen; **B** Zelllinie Jeg3 mit DiI gefärbt und dem DiI Derivat DiI-CM, ungefärbte Jeg3 Zellen dienen als Kontrolle.

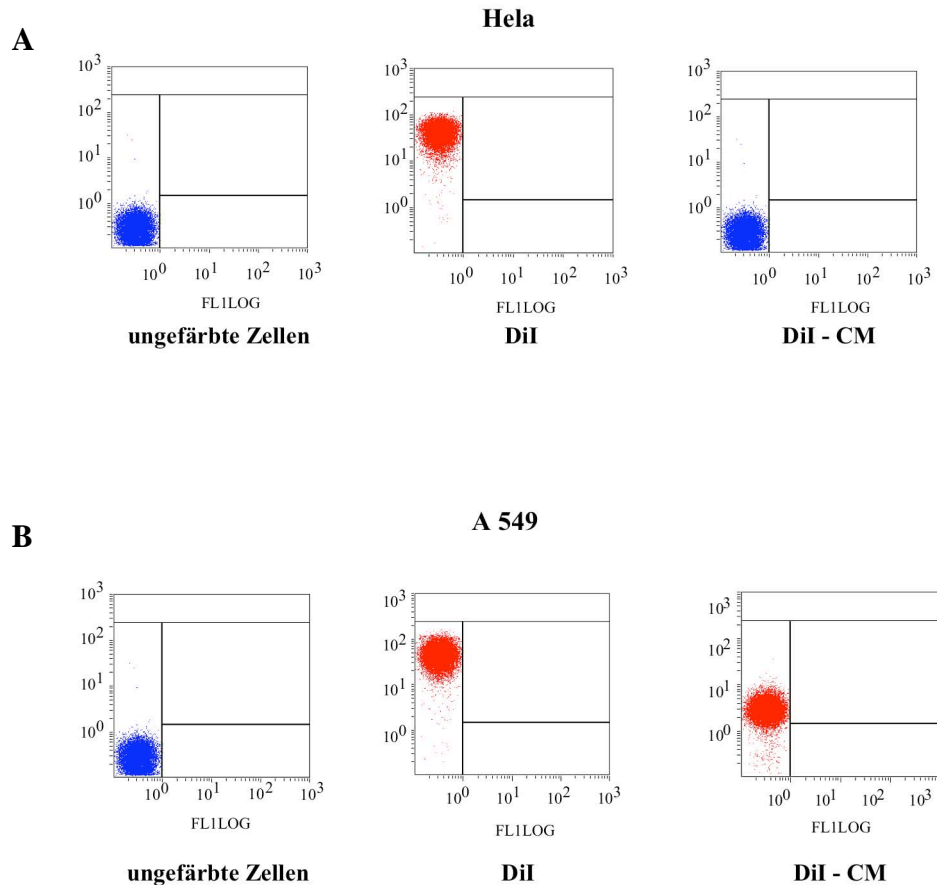


Abb. 26: Dot-plot-Darstellung der DiI Färbung für verschiedene Zelllinien **A** Hela Zellen ebenfalls mit DiI und dem DiI Derivat DiI-CM gefärbt, auch hier dienen ungefärbte Hela Zellen als Kontrolle; **B** die Zelllinie A549 wurden mit DiI und DiI-CM gefärbt, ebenfalls gezeigt ungefärbte A549 Zellen als Kontrolle.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass sich b-End Zellen mit CM-DiI oder SP-DiI nicht färben lassen (Abb. 25 A). Gleiche Resultate wurden bei Jeg 3 Zellen (Abb. 25 B) und Hela Zellen (Abb. 26 A) beobachtet. Die menschliche Lungencarcinoma Zelllinie A549 (Abb. 26 B) konnte zwar mit CM-DiI gefärbt werden, aber die Färbung war nicht so effizient wie die mit DiI.

Da die Derivate des Farbstoffes DiI keine alternative Möglichkeit zur Färbung der Zellen darstellten, wurde als nächstes ein ganz anderer Farbstoff getestet. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA SE), der häufig verwendet wird, um transplantierte Zellen zu markieren. Einmal in die Zelle aufgenommen, bleibt der Farbstoff dort – selbst bei der Zellteilung. Zunächst diffundiert der farblose und nichtfluoreszierende Farbstoff über die Zellmembran ins Zellinnere. Dort werden die Acetat Gruppen von einer unspezifischen Esterase abgespalten, und es kommt zur Fluoreszenz des Farbstoffes (Weston und Parish 1990).

Zunächst wurde die Kinetik der „CFDA SE“-Färbung untersucht. Dazu wurden $0,3 \times 10^6$ b-End Zellen auf 60 mm Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 μM CFDA SE für 15 min bei 37°C und 5% CO_2 gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen, und die Zellen wurden in frischem Medium für unterschiedliche Zeitpunkte weiter inkubiert. Die Färbung wurde dann im Flow Cytometer analysiert. In Abbildung 27 ist das Ergebnis für die Zelllinie b-End gezeigt.

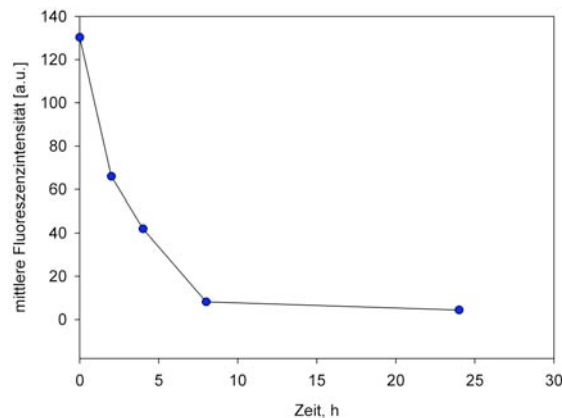


Abb. 27: Mittlere Fluoreszenzintensität des Farbstoffes CFDA SE bei b-End Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Nach der Färbung der b-End Zellen mit dem Farbstoff CFDA SE erfolgte die Messung zu den angegebenen Zeitpunkten am Flow Cytometer. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität des CFDA SE im Verlauf der Zeit

Bereits nach 2h sinkt die mittlere Fluoreszenzintensität um die Hälfte ab. Für diese rapide Abnahme der Fluoreszenzintensität gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnten Transporter den Farbstoff aus der Zelle pumpen, bevor die SE-Reaktion stattfinden kann. Verapamil wäre ein möglicher Inhibitor. Zum anderen könnte es zu einer Acidifizierung kommen. Da das Signal des Carboxyfluorescein pH abhängig ist, ist es bei pH 9 am stärksten. Wenn die SE-Gruppe anstelle der DA-Gruppe hydrolysiert ist, geht der Farbstoff zwar in die Zelle hinein und wird auch durch die Esterasen umgesetzt, wird aber nicht zurück gehalten. Aufgrund des schnellen Fluoreszenzverlustes kam dieser Farbstoff als Alternative zu DiI nicht in Frage.

3.1.1.8 Einfluss von Bestrahlung auf die DiI Färbung

Um „bystander“-Effekte zu untersuchen, ist es notwendig eine Zellpopulation zu bestrahlen. Dabei sollte eine Zellpopulation mit DiI gefärbt und bestrahlt werden und die „bystander“ Population sollte „unberührt“ bleiben. Ein Endpunkt, der im Bezug auf

„bystander“-Effekte untersucht werden sollte, ist der G₂-Block. Daher musste zunächst der Einfluss von DiI nach Bestrahlung sowohl mit Röntgenstrahlen als auch mit Neutronen auf die G₂-Phase untersucht werden. Dazu wurden b-End Zellen zunächst adhärent mit 5 µM DiI für 1h bei 37°C und 5% CO₂ gefärbt. Die Färbelösung wurde anschließend abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen. Danach erhielten die Zellen frisches Medium und wurden mit 3 Gy Neutronen bzw. 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt (vgl. 2.9). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsinisiert und für ein DNA-Histogramm fixiert und gefärbt (vgl. 2.14). Die Proben wurden dann mit Hilfe des Flow Cytometers analysiert (vgl. 2.10). Die Verteilung der G₂-Phase nach der Bestrahlung ist in Abbildung 28 dargestellt.

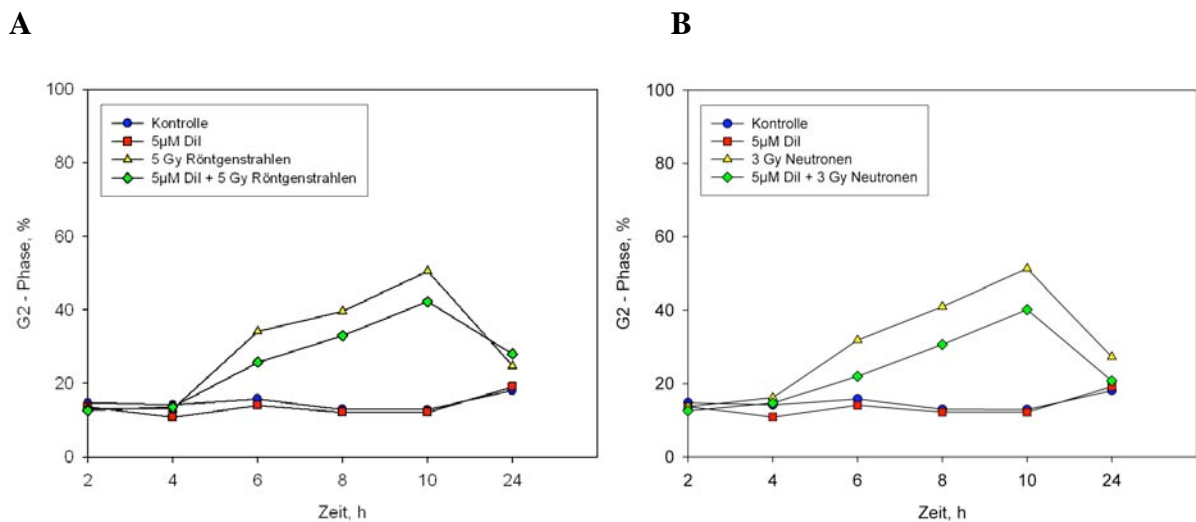


Abb. 28: A Einfluss von Röntgenstrahlung auf die G₂-Phase von DiI gefärbten b-End Zellen; B Einfluss von Neutronenbestrahlung auf die G₂-Phase von DiI gefärbten b-End Zellen

Die Färbung der b-End Zellen mit DiI hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus wie ein Vergleich mit den Kontrollen zeigt. Zellen, die mit Röntgenstrahlen oder Neutronen bestrahlt wurden, zeigen nach 4h einen erhöhten Anteil der G₂-Phase. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase erreicht 10h nach der Bestrahlung sein Maximum. Auch die mit DiI gefärbten b-End Zellen, die anschließend mit Röntgenstrahlen bzw. Neutronen bestrahlt wurden, zeigen 4h nach der Bestrahlung eine Erhöhung der G₂-Phase. Auch hier erreicht der Anteil der G₂-Phase nach 10h sein Maximum. Somit konnte gezeigt werden, dass DiI in Kombination mit Bestrahlung keinen Einfluss auf den Zellzyklus hat.

3.1.2 Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM

3.1.2.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM

Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung von strahleninduzierten Effekten in nicht direkt bestrahlten Zellen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf solche strahleninduzierte Effekte gelegt, die über interzelluläre Kommunikation via gap junctions vermittelt werden. Um nachzuweisen, dass Zellen in der Lage sind, über gap junction Kanäle zu kommunizieren, wurde ein Assay entwickelt, mit dem der Grad der interzellulären Kommunikation (=Kopplung) gemessen werden kann (vgl. 2.11). Bislang wurde interzelluläre Kommunikation über gap junctions gemessen, indem man eine Zelle mit einem permeablen Farbstoff, wie z.B. Lucifer yellow oder Propidiumiodid gefärbt hat und anschließend ausgezählt hat, in wie viele Zellen sich der Farbstoff verteilt hat. Obwohl man mit Hilfe dieser Methode Aussagen darüber treffen kann, ob interzelluläre Kommunikation stattfindet oder nicht, ist sie dennoch limitiert, denn die Ergebnisse sind qualitativ und erlauben keine quantitative Bewertung der interzellulären Kommunikation über gap junctions. Hinzu kommt, dass die Auszählung der Zellen subjektiv ist, was zu Schwankungen in den Ergebnissen führt. Ferner hängt die Permeabilität des Farbstoffes von der Connexin Isoform der getesteten Zelllinie ab.

Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurde der „*Parachute Assay*“ (Ziambaras, Lecanda et al. 1998; Czyz, Irmer et al. 2000; Czyz, Irmer et al. 2000) in modifizierter Form angewendet (vgl. 2.11). Diese Methode basiert auf dem Transfer von Calcein aus gefärbten Donorzellen zu ungefärbten Akzeptorzellen über gap junctions. Bevor der Farbstoff verwendet wurde, um den Grad der interzellulären Kommunikation zu ermitteln, wurden zunächst seine Eigenschaften untersucht.

3.1.2.2 Mechanismus der Calcein Färbung

Die Acetoxymethyl (AM) Ester Derivate der fluoreszierenden Indikatoren und Chelatoren gehören zu den am meisten genutzten Verbindungen, um lebende Zellen zu untersuchen (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition).

Durch die Modifikation der Carbonsäuren mit AM Ester entsteht ein ungeladenes Molekül, welches die Zellmembran passieren kann. Innerhalb der Zelle werden die lipophilen Schutzgruppen durch eine unspezifische Esterase wieder entfernt. Das nun geladene Molekül kann die Zelle nur noch über gap junctions verlassen. Ein Molekül mit den beschriebenen Eigenschaften ist der Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM. Abbildung 29 zeigt seine chemische Struktur.

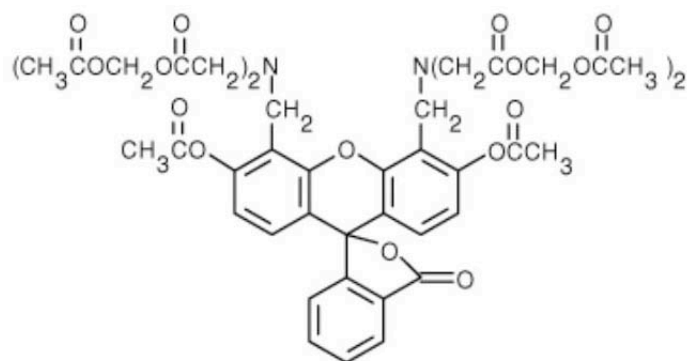


Abb. 29: chemische Struktur von N,N'-[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-4',5'-diyl]bis(methylen)]bis[N-[2-[acetyloxy)methyloxy]-2-oxoethyl]bis[(acetyloxy)methyl]ester (Calcein AM), (aus: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition)

Zellen können sowohl adhären als auch in Suspension passiv mit Calcein AM gefärbt werden. In der Zelle entsteht durch die Spaltung mit einer unspezifischen Esterase ein fluoreszierendes Produkt, das von Zellen mit intakter Zellmembran zurück gehalten wird. Calcein, das Hydrolyseprodukt von Calcein AM, ist ein polyanionisches Fluorescein Derivat mit sechs negativen und zwei positiven Gruppen bei pH 7.

Die physikalischen Eigenschaften sind in Abbildung 30 zusammengefasst. Das Emissionsmaximum liegt bei 525 nm, das Absorptionsmaximum bei 490 nm. In den folgenden Experimenten wurde Calcein mit einem Argon Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert, angeregt.

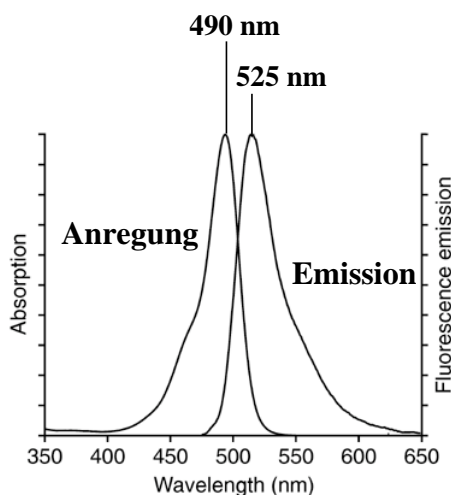


Abb.30: Absorptions- und Emissionsspektrum von Calcein (aus: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition).

Für die Messung der interzellulären Kommunikation wurde eine Zellpopulation mit Calcein AM gefärbt und die andere zur gleichen Zeit mit DiI. Anschließend erfolgte die Co-Kultivierung der beiden Zellpopulationen für verschiedene Zeitspannen. Wenn in der zu untersuchenden Zelllinie gap junctions ausgebildet sind, wird nur der Farbstoff Calcein über gap junctions in die DiI gefärbte Zellpopulation übertragen.

Ebenso wie für den Fluoreszenzfarbstoff DiI wurden die b-End und die Jeg3 Zellen verwendet, um die Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein näher zu untersuchen. Dazu wurden folgende Parameter betrachtet: 1) Wie sollten die Zellen gefärbt werden? Adhärent oder in Suspension?; 2) die Färbedauer; 3) die Toxizität; 4) die Stabilität der Färbung. Im folgenden werden die Ergebnisse dargestellt.

3.1.2.3 Färbung: adhärent oder in Suspension?

Um zu untersuchen, ob die Zellen besser adhärent oder in Suspension gefärbt werden, wurde folgendes Experiment durchgeführt: 48h vor dem Experiment wurden $0,5 \times 10^6$ b-End und 1×10^6 Jeg3 Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert (vgl. 2.7.2). Vor Beginn der Experimente wurden von jeder Zelllinie die Zellen einer Petrischale abgelöst und die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.7.5). 48h nachdem die Zellen ausplattiert wurden, befanden sich $2,2 \times 10^6$ b-End Zellen und $3,1 \times 10^6$ Jeg3 Zellen in einer Petrischale.

Für das eigentliche Experiment wurden zwei Ansätze hergestellt. In dem ersten Ansatz wurden die Zellen adhärent gefärbt. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 1 mM Calcein (vgl. 2.11) für 30 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 1xPBS gewaschen, trypsiniert und in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Analyse im Flow Cytometer (vgl. 2.10). In dem zweiten Ansatz wurden die Zellen zunächst trypsiniert und anschließend in Suspension, wie oben beschrieben, gefärbt. Direkt nach der Färbung wurden auch diese Zellen im Flow Cytometer untersucht. Abbildung 31 fasst die Daten zusammen.

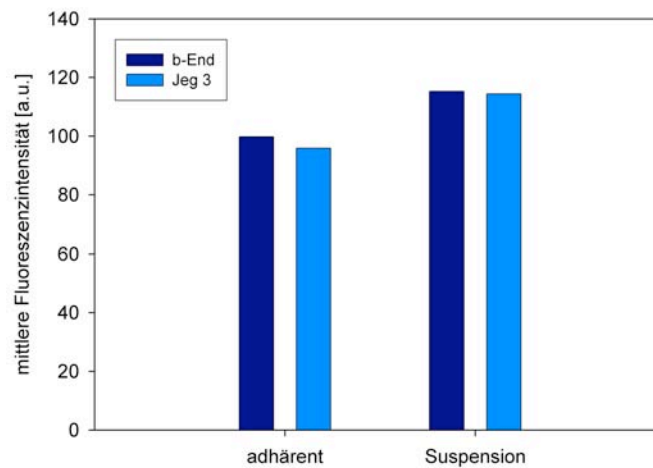


Abb.31: Mittlere Fluoreszenzintensität bei Calcein gefärbten b-End und Jeg3 Zellen. Entweder wurden die Zellen adhären mit Calcein gefärbt oder die Zellen wurden zunächst trypsiniert und anschließend in Suspension mit Calcein gefärbt.

Bei der Färbung mit Calcein AM sind die Unterschiede zwischen der adhären Färbung und der Färbung in Suspension nicht so erheblich wie bei der Färbung mit DiI. Jedoch ist die Färbung in Suspension homogener als im adhären Zustand. Sowohl für die Zelllinie b-End als auch für die Zelllinie Jeg3 wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, so dass die Färbung mit Calcein AM in den folgenden Experimenten in Suspension erfolgte.

3.1.2.4 Kinetik der Calcein Färbung

Um die Kinetik der Calcein Färbung zu untersuchen, wurden $0,5 \times 10^6$ b-End / 100 mm Petrischale und 1×10^6 Jeg3 / 100 mm Petrischale ausplattiert (vgl. 2.7.2) und für 48h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen trypsiniert und in Suspension mit 1 mM Calcein gefärbt (vgl. 2.11). Die Intensität der Färbung wurde nach 10, 20, 30, 40, 60 und 90 min mit Hilfe des Flow Cytometers ausgewertet. Die Messung der Calcein Färbung für b-End und Jeg3 Zellen ist in Abbildung 32 dargestellt.

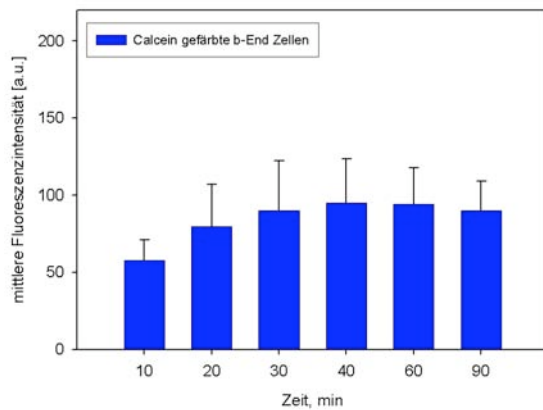
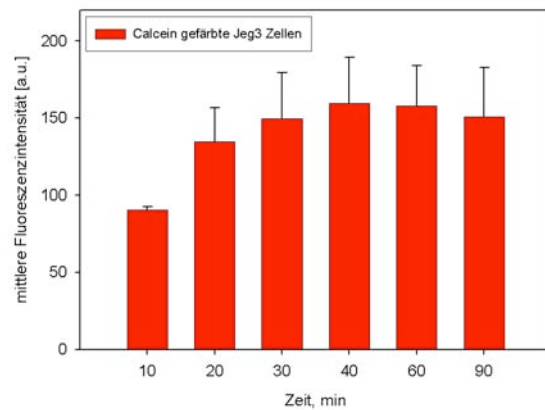
A**B**

Abb. 32: A mittlere Fluoreszenzintensität der Calcein Färbung in Abhängigkeit von der Zeit bei b-End Zellen; B mittlere Fluoreszenzintensität der Calcein Färbung bei Jeg3 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Die Balkendiagramme in Abbildung 32 zeigen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität des Calceins im Verlauf der Zeit, sowohl für die b-End als auch für die Jeg3 Zellen. Nach 40 min erreicht die Intensität bei beiden Zelllinien ein Maximum und nimmt dann langsam ab. Daher wurde im Folgenden eine Färbezeit von 30 min gewählt. Zu diesem Zeitpunkt erhält man ein starkes Fluoreszenzsignal und die Zellen sind homogen gefärbt.

In einem weiterführenden Experiment wurde die Haltbarkeit der Calcein Färbung untersucht. Dazu wurden die b-End und die Jeg3 Zellen mit 1 mM Calcein für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ gefärbt (vgl. 2.11). Nach der Färbung wurden je $0,1 \times 10^6$ Zellen auf 60 mm Petrischalen ausplattiert und die Fluoreszenzintensität des Calceins wurde für Zeitpunkte von 30 min bis zu 168h verfolgt. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Zellen trypsiniert, in 2 ml Medium resuspendiert und anschließend im Flow Cytometer analysiert.

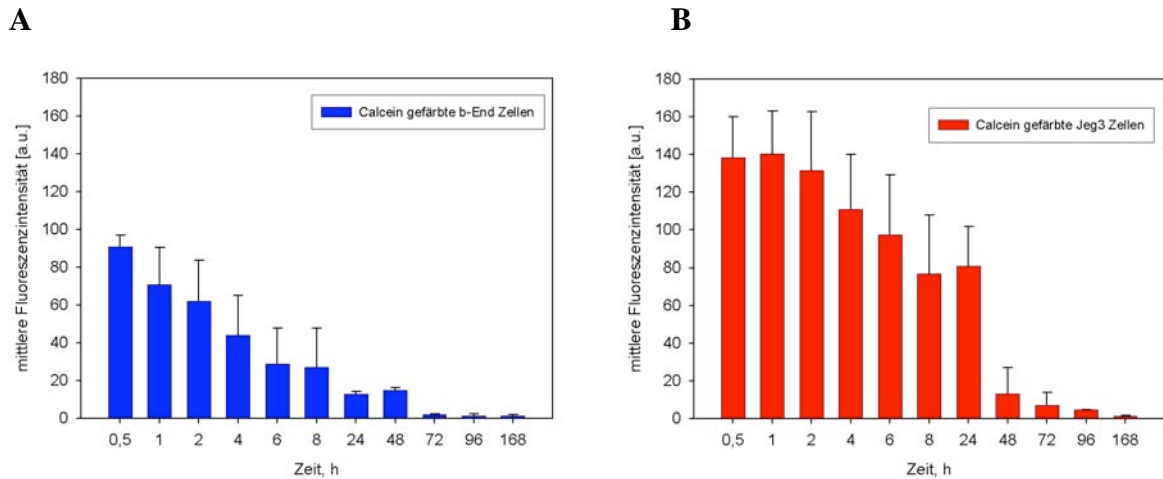


Abb. 33: A Mittlere Fluoreszenzintensität der Calcein Färbung in Abhängigkeit von der Zeit bei b-End Zellen; B mittlere Fluoreszenzintensität der Calcein Färbung bei Jeg3 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Wie aus diesen Daten hervorgeht, wird das Calcein in einem Zeitraum von 24h fast vollständig metabolisiert. Bei den b-End Zellen ist die Fluoreszenzintensität des Calceins nicht so hoch wie bei den Jeg3 Zellen.

3.1.2.5 Toxizität der Calcein Färbung

Calcein wurde verwendet, um die interzelluläre Kommunikation über gap junctions nachzuweisen. Hierzu musste überprüft werden, ob diese Substanz toxisch ist bzw. das Wachstum der Zellen beeinflusst. Für diese Fragestellung wurden $0,5 \times 10^6$ b-End Zellen und 1×10^6 Jeg3 Zellen für 48h auf 100 mm Petrischalen ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 mM Calcein AM für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen mit frischem Medium + 1% FKS gewaschen und je $0,1 \times 10^6$ Zellen wurden auf 60 mm Petrischalen ausplattiert. Das Zellwachstum wurde für 6 Tage verfolgt. Abbildung 34 fasst die Ergebnisse für die b-End und Jeg3 Zellen zusammen.

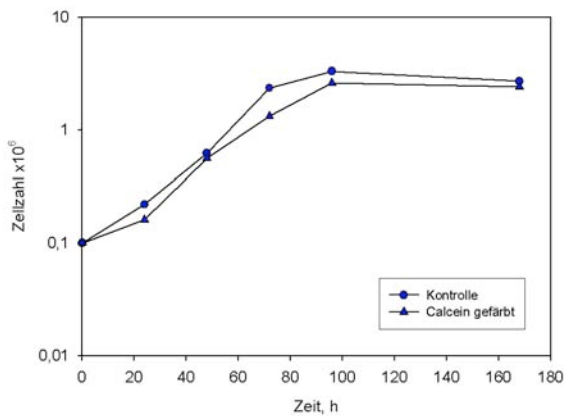
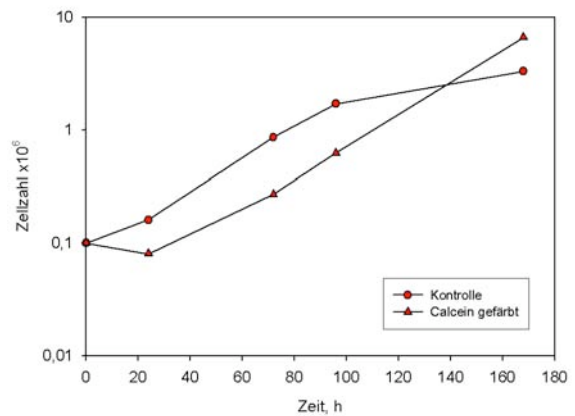
A**B**

Abb. 34: A Wachstumskurve b-End Zellen. Die b-End Zellen wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Dazu erfolgte alle 24h, sowohl von den ungefärbten b-End Zellen (blauer Punkt), als auch von den mit Calcein gefärbten Zellen (blaues Dreieck) eine Zellzahlbestimmung. In der Abbildung sind die Zellzahlen gegen die Zeit aufgetragen. **B Wachstumskurve Jeg3 Zellen.** Die Jeg3 Zellen wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Dazu erfolgte alle 24h, sowohl von den ungefärbten Jeg3 Zellen (roter Punkt), als auch von den mit Calcein gefärbten Zellen (rotes Dreieck) eine Zellzahlbestimmung. Auch in dieser Abbildung sind die Zellzahlen gegen die Zeit aufgetragen.

Vergleicht man die Zellzahlen der ungefärbten b-End Zellen mit denen der Calcein gefärbten b-End Zellen, so zeigt sich kein signifikanter Einfluss der Calcein Färbung auf das Wachstum der Zellen. Die Calcein gefärbten Jeg3 Zellen hingegen zeigen im Vergleich zu den Kontrollen ein leicht verzögertes Wachstum.

3.2. Interzelluläre Kommunikation

3.2.1 Methode zum Nachweis der interzellulären Kommunikation über gap junctions

Zum Nachweis der interzellulären Kommunikation über gap junctions, wurde der *Parachute Assay* in modifizierter Form angewendet (vgl. 2.11), der sich nach Färbung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen DiI und Calcein AM (I) in eine Co-Kulturphase (II), die Kopplung (III), eine Transferphase (IV) und schließlich in eine Analyse am Flow Cytometer (V) gliedert. Abbildung 35 gibt eine schematische Übersicht über den experimentellen Verlauf.

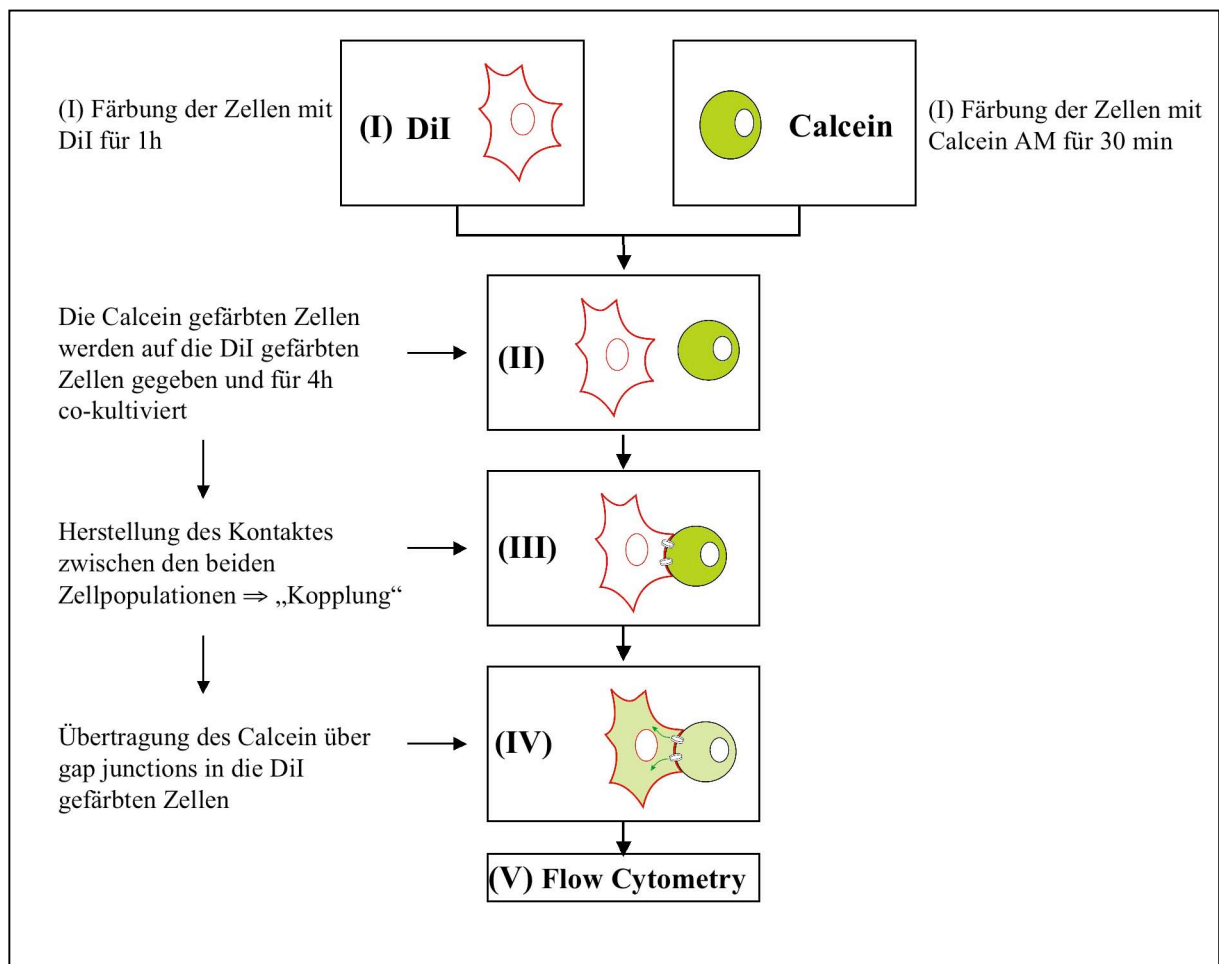


Abb. 35: Modifizierter *Parachute Assay* zum Nachweis der interzellulären Kommunikation über gap junctions mit den Fluoreszenzfarbstoffen DiI und Calcein AM. Genaue Erklärungen im Text.

Eine adhärenzte Zellpopulation wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI gefärbt (vgl. 2.11), während die andere Zellpopulation derselben Zellart in Suspension mit dem Farbstoff Calcein AM gefärbt wurde. Anschließend wurden die Calcein gefärbten Zellen auf die DiI gefärbten Zellen in einem Verhältnis von 2:1 gegeben. Die Zellpopulationen wurden für 4h co-kultiviert. Falls die zu untersuchende Zelllinie über gap junctions verfügte, erfolgte während der Co-Kultur ein Transfer des Calceins über die gap junctions in die DiI gefärbten Zellen. Nach der Co-Kultivierung wurden die Zellen trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert. Danach erfolgte eine Analyse der Zellen im FACS-Gerät (vgl. 2.10). Abbildung 36 A zeigt das Dot-plot-Histogramm von kommunizierenden b-End Zellen (vgl. 2.7.2). Diese Zelllinie exprimiert die Connexine Cx 37, Cx 40 und Cx 43 und ist somit in der Lage, über gap junctions zu koppeln (Montesano *et al.*, 1990). Eine Zellkopplung zwischen den beiden Populationen, also ein Fluss von Calcein von den Donor- zu den Akzeptorzellen, war am Shift der Akzeptorzell-Population in Richtung Grün-Fluoreszenz (FL-1) zu erkennen. Diese Zellen sind im Dot-plot-Histogramm gelb dargestellt. Die im Dot-plot-Histogramm violett dargestellten Zellen symbolisieren den Farbübertrag von den DiI gefärbten Zellen auf die Calcein gefärbten Zellen. Da es sich hierbei nicht um Kopplung zwischen den Zellen handelt, sind diese farblich von den koppelnden Zellen abgegrenzt und werden so auch nicht in die Berechnung des Kopplungsgrades einbezogen. Dieser wurde mit Hilfe der unter 2.11 beschriebenen Formel berechnet und betrug für die b-End Zellen 97%. In Abbildung 36 B zeigt das Dot-plot-Histogramm der Jeg3 Zellen (vgl. 2.7.2). Diese humane Chorionkarzinomzelllinie (ATCC HTB-36; Kohler und Bridson, 1971) ist kommunikationsdefizient, denn sie besitzt die dafür benötigten Connexine nicht. Im Dot-plot-Histogramm zeigt diese Zelllinie daher keine gelbe Population.

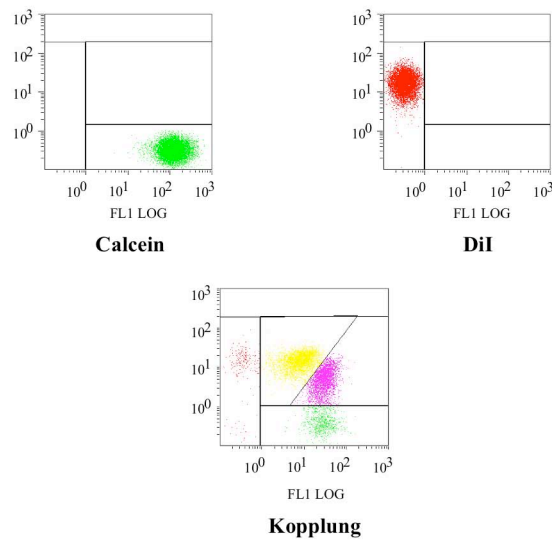
A

Abb. 36 A: Dot-plot-Histogramme der Zelllinie **b-End**; die Donorzellen, die mit Calcein gefärbt wurden, sind durch eine hohe Grün - Fluoreszenz im FL-1 Kanal gekennzeichnet. Das Dot-plot-Histogramm ist dementsprechend in grün dargestellt. Der *dot plot* der DiI gefärbten Akzeptorzellen zeigt eine starke rote Fluoreszenz im FL-2 Kanal. Eine Zellkopplung zwischen den beiden Populationen, wurde im Dot-plot-Histogramm gelb dargestellt. Die violetten Zellen symbolisieren den Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf Calcein gefärbte Zellen.

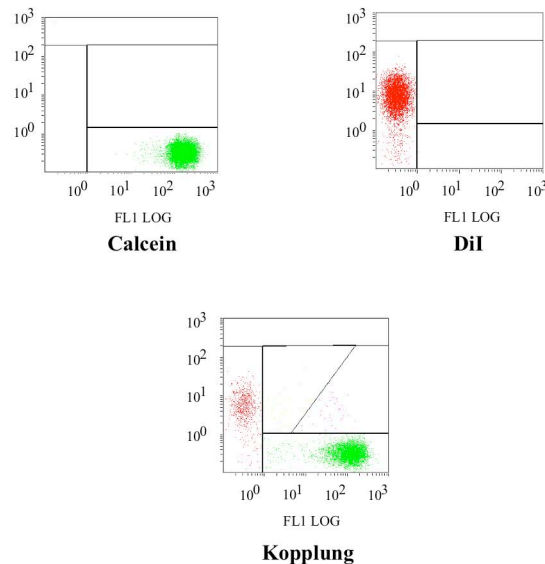
B

Abb. 36 B: Dot-plot-Histogramme der Zelllinie **Jeg3**; die Donorzellen, die mit Calcein gefärbt wurden, sind durch eine hohe Grün - Fluoreszenz im FL-1 Kanal gekennzeichnet. Das Dot-plot-Histogramm ist dementsprechend in grün dargestellt. Der *dot plot* der DiI gefärbten Akzeptorzellen zeigt eine starke rote Fluoreszenz im FL-2 Kanal. Wenn es bei dieser Zelllinie eine Kopplung zwischen den beiden Populationen geben würde, wäre die Kopplung im Dot-plot-Histogramm gelb dargestellt. Die violetten Zellen symbolisieren den Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf Calcein gefärbte Zellen.

3.2.2 Zeitabhängigkeit der Kopplung in b-End Zellen

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die Kopplungszeit auf den Kopplungsgrad haben könnte. Dazu wurden die Zellpopulationen für verschiedene Zeitspannen co-kultiviert (vgl. 2.11) und danach im FACS-Gerät analysiert. Mit Hilfe der in Kapitel 2.11 beschriebenen Formel wurde der Kopplungsgrad berechnet und im zeitlichen Verlauf graphisch dargestellt (Abb. 37).

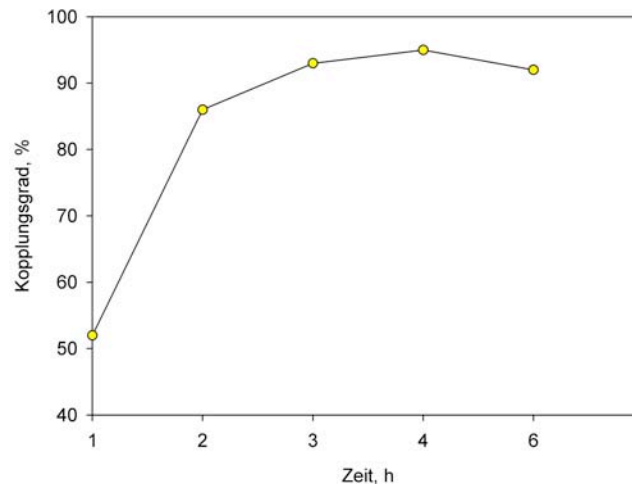


Abb. 37: Kopplungsgrad der b-End Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die b-End Zellen wurden zunächst mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein und DiI gefärbt und anschließend für die gezeigten Zeitpunkte co-kultiviert. Nach Messung der Kopplung im Flow Cytometer wurde der Kopplungsgrad (%) ermittelt und gegen die Zeit (h) aufgetragen.

Bereits 1h nach Beginn des Experimentes zeigen die Zellen eine Kopplungseffizienz von 52%. Das bedeutet, dass schon nach 1h über die Hälfte der Zellen in der Lage sind, über gap junctions miteinander zu kommunizieren. Dieses Ergebnis ist für die folgenden „bystander“-Experimente von Bedeutung. In diesen Experimenten lag der Schwerpunkt auf der Fragestellung, welche Rolle die interzelluläre Kommunikation über gap junctions bei der Entwicklung von „bystander“-Effekten spielt. Daher muss sichergestellt sein, dass die Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten auch in der Lage sind, über gap junctions zu kommunizieren. Die Kopplungseffizienz nimmt im weiteren Verlauf weiter zu. Nach 2h kommunizieren 86% der b-End Zellen über gap junctions. Ein Maximum der Kopplungseffizienz (95%) wird nach 4h erreicht. Demnach ist die Anzahl der Zellen, die über gap junctions kommunizieren, von der Zeit abhängig und je länger Zellen miteinander co-kultiviert werden, desto höher ist die Kopplungseffizienz.

Allerdings kommt es nach einer Kopplungszeit von 24h wieder zu einer Abnahme der Kopplungseffizienz auf 40-50% (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Optimierung der Kopplung in b-End Zellen

In den bisherigen Versuchen, wurden für die Kopplung zweimal so viele Calcein gefärbte Donorzellen eingesetzt, wie DiI gefärbte Akzeptorzellen vorhanden waren. Im folgenden Experiment wurde überprüft, ob die Kopplungseffizienz durch ein verändertes Verhältnis von Donor- zu Akzeptorzellen beeinflusst werden kann. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll (vgl. 2.11) gefärbt. Anschließend wurden sie in den folgenden Verhältnissen 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 (Calcein gefärbte Donorzellen : DiI gefärbte Akzeptorzellen) für 4h co-kultiviert.

Die Ergebnisse für die Zelllinie b-End sind in Abbildung 38 zusammengefasst.

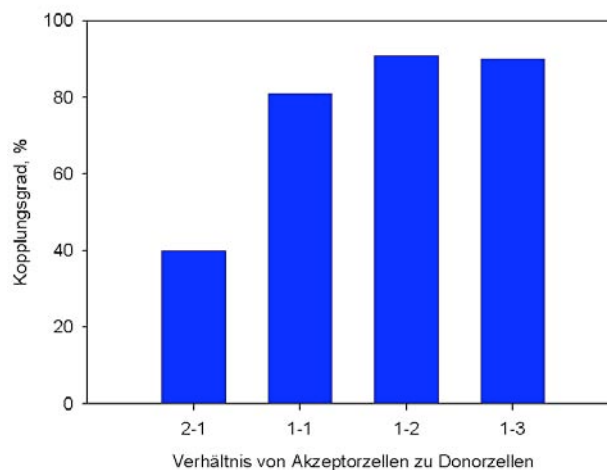


Abb. 38: Kopplungsgrad von b-End Zellen in Abhängigkeit vom Verhältnis der Akzeptorzellen (DiI gefärbte Zellen) zu den Donorzellen (Calcein gefärbte Zellen)

Wie aus den Daten in Abbildung 38 hervorgeht, hängt die Kopplungseffizienz von dem Verhältnis der Akzeptorzellen zu den Donorzellen ab. Wenn man doppelt so viele DiI gefärbte Akzeptorzellen wie Calcein gefärbte Donorzellen hat, liegt der Kopplungsgrad bei 40%. Bei einem Verhältnis von 1:1 verdoppelt sich der Kopplungsgrad auf 81%. Wie aus dem Experiment hervorgeht, ist ein Verhältnis von doppelt so vielen Donorzellen wie Akzeptorzellen am günstigsten. Daher wurden für die Kopplungen immer zweimal mehr Calcein gefärbte Donorzellen als DiI gefärbte Akzeptorzellen eingesetzt.

3.2.4 Optimierung der Kopplung in Abhängigkeit von der Zellzahl

Ein weiterer wichtiger Parameter, der untersucht wurde, war die Abhängigkeit der Kopplungseffizienz von der Zellzahl. Für dieses Experiment wurden die b-End Zellen mit einer Zellzahl von $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$ und $0,5 \times 10^6$ pro Petrischale ausplattiert, so dass am Tag des Experimentes Kopplungen mit unterschiedlichen Zellzahlen angesetzt werden konnten. Die Kopplungen wurden nach dem in Kapitel 2.11 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Nach einer Kopplungszeit von 4h wurden die b-End Zellen trypsinisiert und in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Analyse der Kopplungen im Flow Cytometer (vgl. 2.10 und 2.11). In der Abbildung 39 sind die Ergebnisse dargestellt.

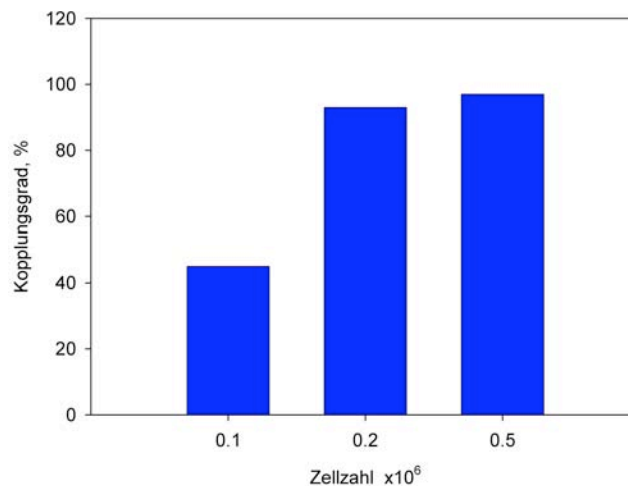


Abb. 39: Balkendiagramm für den Kopplungsgrad in % bei b-End Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl

Dieses Experiment zeigt, dass die Kopplungseffizienz mit größerer Zellzahl optimiert werden konnte. Wenn $0,1 \times 10^6$ Zellen für die Kopplung ausplattiert werden, dann ist die Zellzahl am Tag der Kopplung gering und nur 45% der b-End Zellen sind in der Lage über gap junctions zu kommunizieren. Bei $0,2 \times 10^6$ ausplattierten Zellen liegt der Kopplungsgrad bei 93%. Dieses Ergebnis musste bei den Experimenten, in denen „bystander“-Effekte (vgl. 2.13) untersucht wurden, berücksichtigt werden. Daher wurden für diese Experimente Zelllinien mit ihrer jeweils optimierten Zellzahl auf 100 mm Petrischalen ausgesät (vgl. 2.7.2).

3.2.5 Einfluss der Bestrahlung auf die Kopplung in b-End Zellen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Bestrahlung der Zellen auf die Kopplung hat, wurden die Akzeptorzellen zunächst mit DiI gefärbt und anschließend mit unterschiedlichen Dosen von Röntgenstrahlen bestrahlt (vgl. 2.9.1). Die Donorzellen wurden mit Calcein gefärbt und im Verhältnis 2:1 auf die Akzeptorzellen gegeben. Nach einer Kopplungszeit von 4h wurden die Zellen trypsiniert und in 2ml frischem Medium aufgenommen. Die Auswertung der Kopplung erfolgte am Flow Cytometer (Abb. 40).

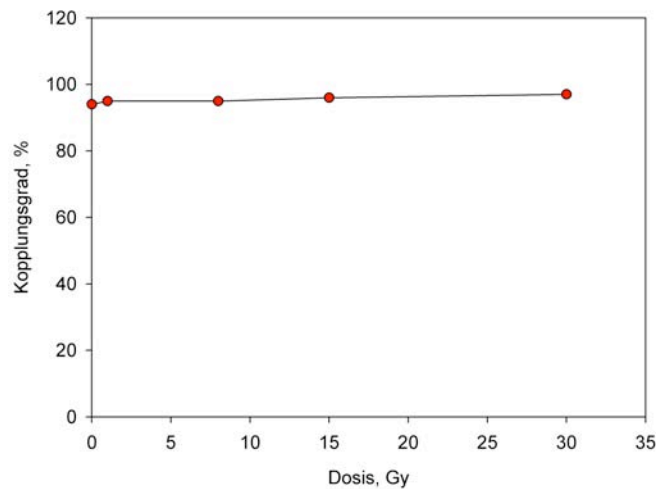


Abb. 40: Einfluss der Bestrahlungsdosis auf den Kopplungsgrad für b-End Zellen. Die b-End Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlung bestrahlt. Nach einer Kopplungszeit von 4h wurde die Kopplung mit Hilfe des Flow Cytometers gemessen. Der Kopplungsgrad (%) wurde graphisch gegen die Bestrahlungsdosis (Gy) aufgetragen.

Die Bestrahlung der Zellen hat keinen Einfluss auf die Kopplungseffizienz der Zellen. Dieses konnte sowohl für niedrige Dosen (3 Gy) als auch für hohe Dosen (30 Gy) ermittelt werden. Bei einem reziproken Versuch, in dem die Calcein gefärbten Donorzellen bestrahlt wurden, koppelten ebenfalls 97% der Zellen. Der Kopplungsgrad ist also unabhängig davon, welche der beiden Zellpopulationen bestrahlt wird und mit welcher Dosis diese Zellen bestrahlt werden.

Da zur Untersuchung der „bystander“-Effekte die Zellen auch mit Neutronen bestrahlt werden sollten, wurde der Einfluss von hoch LET Strahlung auf die Kopplungseffizienz untersucht. Dazu wurden die Donorzellen zunächst mit Calcein gefärbt und anschließend mit 3 Gy Neutronen bestrahlt (vgl. 2.9.2). Die Calcein gefärbten Zellen wurden im Verhältnis 2:1 auf die DiI gefärbten Akzeptorzellen gegeben. Nach einer Kopplungszeit von 4h wurden die Zellen trypsiniert und in 2 ml frischem Medium

aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Proben am Flow Cytometer (vgl. 2.10). Auch nach der Bestrahlung mit Neutronen zeigten die b-End Zellen eine Kopplungseffizienz von 97% (Daten nicht gezeigt).

3.3 Untersuchung der p53 Aktivierung nach Bestrahlung

In der vorliegenden Arbeit wurden Co-Kultivierungsexperimente entwickelt, die es ermöglichen, strahleninduzierte Effekte in nicht direkt bestrahlten Zellen zu untersuchen. Diese sogenannten „bystander“ Zellen wurden für verschiedene Zeitpunkte mit bestrahlten Zellen co-kultiviert und anschließend durch Zellsortierung wieder voneinander getrennt (vgl. 3.4.1). Danach konnte eine getrennte Untersuchung der Zellreaktion sowohl der bestrahlten Zellpopulation als auch der unbestrahlten Zellpopulation erfolgen. Ein Endpunkt, der in den „bystander“ Zellen untersucht werden sollte, war die Induktion von p53 als Indikator für die Aktivierung des G₁ Kontrollpunktes. Dabei sollte mittels Western Blot Analyse die spezifische Phosphorylierung des p53 am Ser-15 untersucht werden.

3.3.1 p53 nach Röntgenbestrahlung in b-End Zellen

Um die Phosphorylierung des Ser-15 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zu untersuchen wurden $0,5 \times 10^6$ b-End Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert und für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (vgl. 2.7.2). Im Anschluss wurden die Zellen adhärent mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt (vgl. 2.9.1). Nach der Bestrahlung wurden aus den Zellen Proteine gewonnen (vgl. 2.8.1 und 2.8.2) die zur Analyse durch SDS-PAGE (vgl. 2.8.3 und 2.8.4) eingesetzt werden konnten.

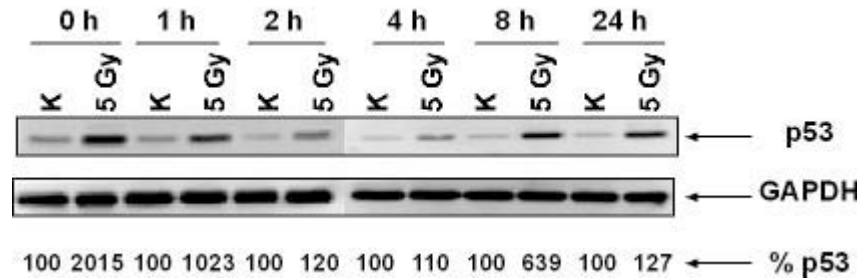


Abb. 41: Western-Blot Analyse der Phosphorylierung des p53 in b-End Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen. Aufgetragen wurden je 20 µg Gesamtprotein. Zum Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Dabei wurde die Kontrolle für die einzelnen Zeitpunkte gleich 100% gesetzt. Abkürzung: K: Kontrolle.

Die Analyse des Western Blots ergab, dass die Phosphorylierung am Ser-15 des p53 bereits direkt nach der Bestrahlung erfolgt. Nach einer Stunde ist bereits das Maximum erreicht. 24h nach Bestrahlung nimmt das Signal ab. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen, die aber sonst genauso behandelt wurden wie die bestrahlten Zellen.

3.3.2 Untersuchung der p53 Phosphorylierung nach Bestrahlung mit Neutronen

Um zu untersuchen, ob p53 nach Bestrahlung mit Neutronen am Ser-15 phosphoryliert wird, wurden $0,5 \times 10^6$ b-End Zellen auf 100 mm Petrischalen ausplattiert und für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (vgl. 2.7.2). Anschließend wurden die Zellen adhärent mit 1,5 Gy und 3 Gy Neutronen bestrahlt (vgl. 2.9.2). Nach der Bestrahlung wurden aus den Zellen Proteine gewonnen (vgl. 2.8.1 und 2.8.2), die zur Analyse durch SDS-PAGE (vgl. 2.8.3 und 2.8.4) eingesetzt werden konnten.

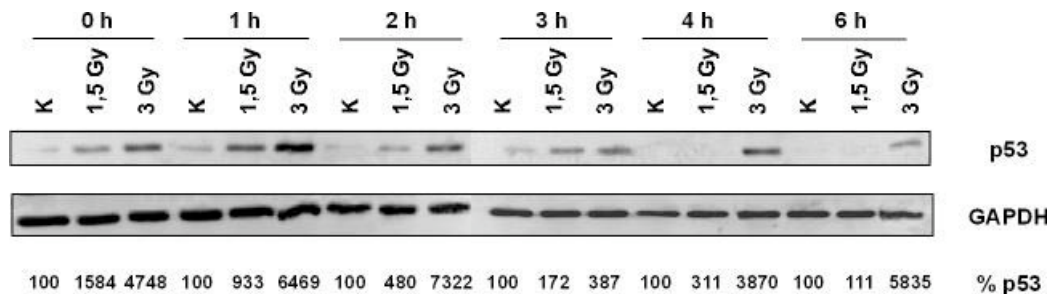


Abb. 42: Western-Blot Analyse der Phosphorylierung des p53 in b-End Zellen nach Bestrahlung mit 1,5 Gy und 3 Gy Neutronen. Aufgetragen wurden je 20 µg Gesamtprotein. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH aufgetragen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Dabei wurde die Kontrolle für die einzelnen Zeitpunkte gleich 100% gesetzt. Abkürzung: K: Kontrolle.

Bereits nach der Bestrahlung mit 1,5 Gy Neutronen erfolgt eine Phosphorylierung des p53. 1h nach Bestrahlung erreicht die Phosphorylierung des p53 ein Maximum. 6h nach der Bestrahlung zeigen die mit 1,5 bestrahlten Zellen dieselbe Menge an phosphoryliertem p53 wie die Kontrollzellen.

Auch nach Bestrahlung mit 3 Gy Neutronen erreicht die Menge an phosphoryliertem p53 nach 1h das Maximum. Jedoch ist hier, im Gegensatz zu den Zellen die mit 1,5 Gy bestrahlt wurden, auch nach 6h noch phosphoryliertes p53 detektierbar.

3.3.3 Analyse des G₂-Block nach Bestrahlung

Ein weiterer DNA-Schadens-Kontrollpunkt, der in den „bystander“ Zellen untersucht werden sollte, war der G₂-Block. Ionisierende Strahlung führt dazu, dass die exponierten Zellen später in die Mitose eintreten als nicht exponierte („Mitose-Verzögerung“). Sehr ausgeprägt ist dabei der G₂-Block, der dosisabhängig für eine bestimmte Zeit aufrecht erhalten wird (ca. 1-2 Stunden pro Gray). Der S-Block ist deutlich kürzer mit etwa 10 min pro Gray. Auch der G₁-Block nach Strahlenexposition ist kürzer. Es wird vermutet, dass diese Verzögerungen im Zellzyklus dazu dienen, der Zelle Zeit zu geben, um Schäden zu reparieren.

3.3.4 G₂-Block nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in b-End Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, wie die Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen durch den Zellzyklus laufen. Dazu wurden die b-End Zellen mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt (vgl. 2.9.1). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsiniert und für ein DNA-Histogramm fixiert und gefärbt (vgl. 2.14). Die Proben wurden dann mit Hilfe des Flow Cytometers analysiert (vgl. 2.10).

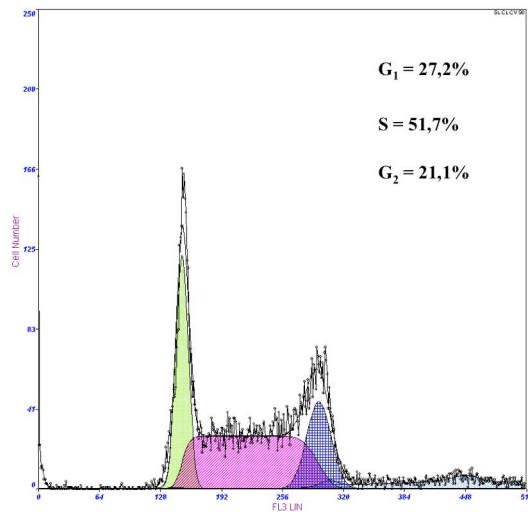
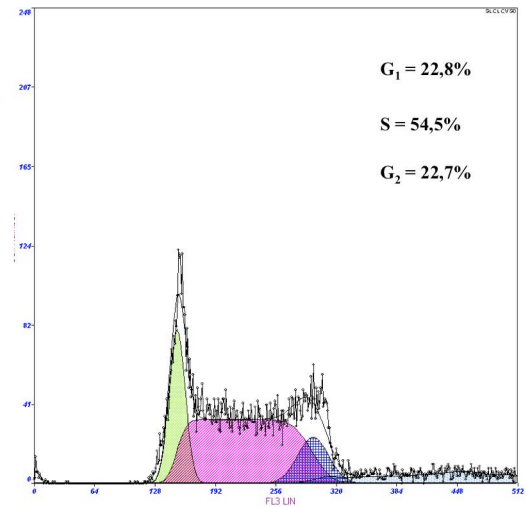
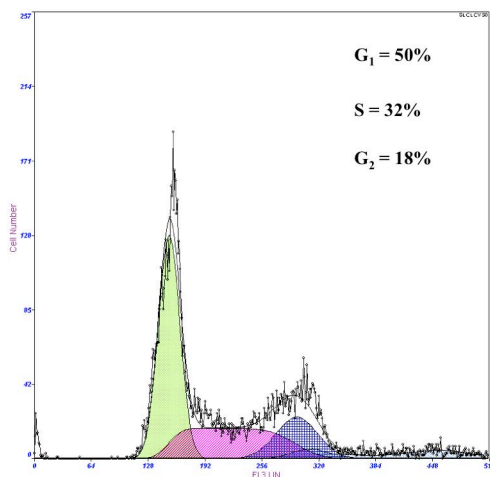
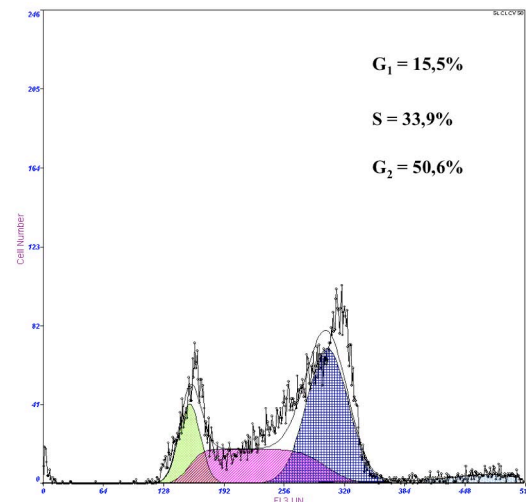
A**B****C****D**

Abb. 43: **A DNA-Histogramm** von unbestrahlten Zellen und **B** von bestrahlten Zellen (5 Gy) direkt nach Beginn des Experimentes; **C DNA-Histogramm** von unbestrahlten Zellen und **D** von bestrahlten Zellen 10h nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen.

Die in Abbildung 43 dargestellten Histogramme zeigen die Zellzyklus Verteilung von b-End Zellen nach 10h. Der Anteil G_1 ist bei den bestrahlten Zellen im Vergleich zu der Kontrollpopulation von 50% auf 15,5% gefallen. Die G_2 Phase zeigt einen Anstieg von 18% auf 50,6%. Auch der Anteil der S-Phase Zellen steigt nach Bestrahlung an. Die Zellen laufen also aus der G_1 Phase und werden nach Bestrahlung in der G_2 Phase gestoppt. In

Abbildung 44 ist die zeitliche Verteilung der G_2 Phase sowohl ohne als auch nach Bestrahlung der Zellen zusammenfassend dargestellt.

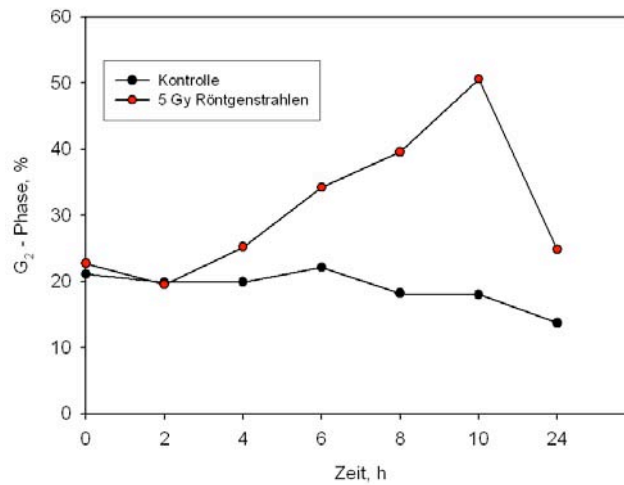


Abb. 44: Prozentualer Anteil der G_2 -Phase in Abhängigkeit von der Zeit in Kontroll-Zellen und nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen.

4h nach Bestrahlung zeigen die Zellen bereits einen leichten G_2 -Block. Der G_2 Anteil ist 10h nach Bestrahlung auf 50,6% gestiegen und hat damit sein Maximum erreicht. Nach 24h sinkt der Anteil G_2 wieder auf 24,8%. Direkt nach der Bestrahlung lag der Anteil an G_2 bei 22,7%. Daraus folgt, dass die Zellen 24h nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wieder in den Ausgangszustand zurückgekehrt sind.

3.3.5 G_2 -Block nach Bestrahlung mit Neutronen

Des weiteren sollte untersucht werden, wie die Zellen nach Bestrahlung mit Neutronen durch den Zellzyklus laufen. Nach Bestrahlung der b-End Zellen mit 3 Gy Neutronen (vgl. 2.9.2), wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten trypsiniert und für ein DNA-Histogramm fixiert und gefärbt (vgl. 2.14). Die Analyse der Proben erfolgte dann mittels Flow Cytometrie (vgl. 2.10). In Abbildung 45 sind beispielhaft DNA-Histogramme dargestellt.

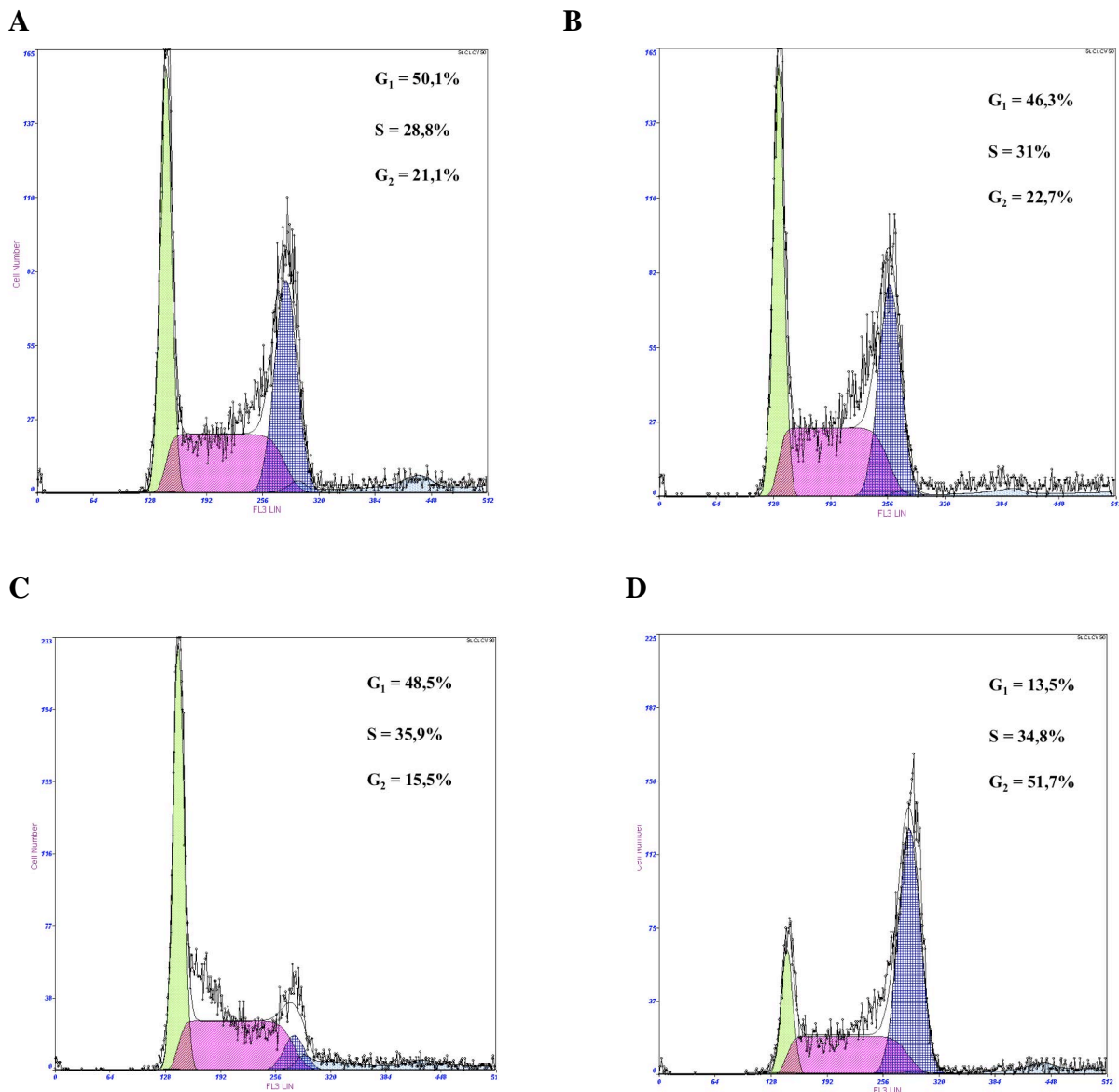


Abb. 45: **A** DNA-Histogramm von unbestrahlten Zellen und **B** von bestrahlten Zellen (3 Gy) direkt nach Beginn des Experimentes; **C** DNA-Histogramm von unbestrahlten Zellen und **D** von bestrahlten Zellen 10h nach Bestrahlung mit 3 Gy.

Die DNA Histogramme in Abbildung 45 zeigen die Zellzyklus Verteilung der b-End Zellen 10h nach Versuchsbeginn. Nach 10h zeigt die bestrahlte Zellpopulation (Abb. 45 D) eine Zunahme des G_2 Anteils von 15,5% auf 51,7%. Der G_1 Anteil dagegen nimmt von 48,5% auf 13,5% ab. Daraus folgt, dass die Zellen zwar aus G_1 heraus laufen in der G_2 -Phase dann aber angehalten werden. In Abbildung 46 ist der G_2 Anteil für die verschiedenen Zeitpunkte zusammenfassend dargestellt.

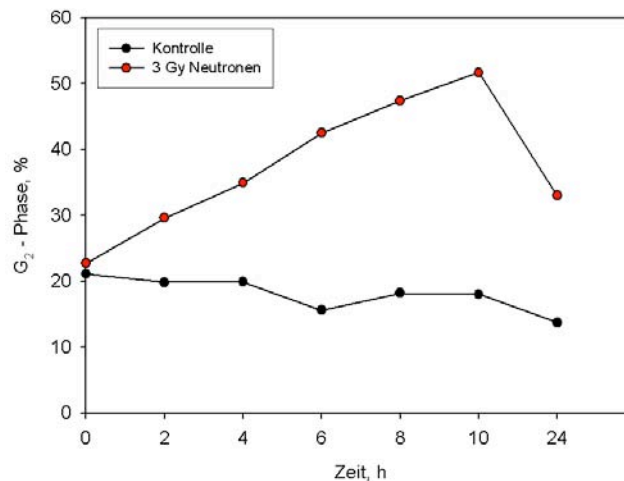


Abbildung 46: Prozentualer Anteil der G₂-Phase in Abhängigkeit von der Zeit in Kontroll-Zellen und nach Bestrahlung mit 3 Gy Neutronen

Während bei der Kontrollpopulation der Anteil der G₂-Phase nahezu konstant ist, zeigt die bestrahlte Zellpopulation bereits 4h nach der Bestrahlung einen deutlichen G₂-Block. Der G₂-Block erreicht nach 10h sein Maximum. Nach 24h ist der G₂ Anteil bereits wieder auf 33% gesunken. Damit liegt der G₂ Anteil aber immer noch 10% höher als direkt nach der Bestrahlung. Der G₂-Block nach Bestrahlung mit Neutronen hält demnach länger an als nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Das lässt sich damit erklären, dass Neutronen im Gegensatz zu Röntgenstrahlen zu dicht ionisierender Strahlung gehören. Bei dicht ionisierender Strahlung folgen die Ionisationsprozesse aufgrund des hohen linearen Energietransfers (LET) sehr dicht hintereinander. Somit liegen auch die DNA Schäden dichter nebeneinander und das zu reparierende Schadensmuster ist aufwendiger und benötigt mehr Zeit.

3.4 „Bystander“ – Effekte

3.4.1 Neue Verfahrensweisen zur Untersuchung von „bystander“-Effekten

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, um „bystander“-Effekte ohne partielle Bestrahlung mit einem Microbeam und ohne Mediumtransfer zu untersuchen. Bei dieser neuen Technik wird eine Zellpopulation mit DiI gefärbt und bestrahlt (Abb. 47) (I a) und anschließend mit unbehandelten Zellen (I b) für verschiedene Zeiten co-kultiviert (II). Im Anschluss daran erfolgt die Kopplungsphase (III) nach deren Ende die Zellen sortiert werden (IV).

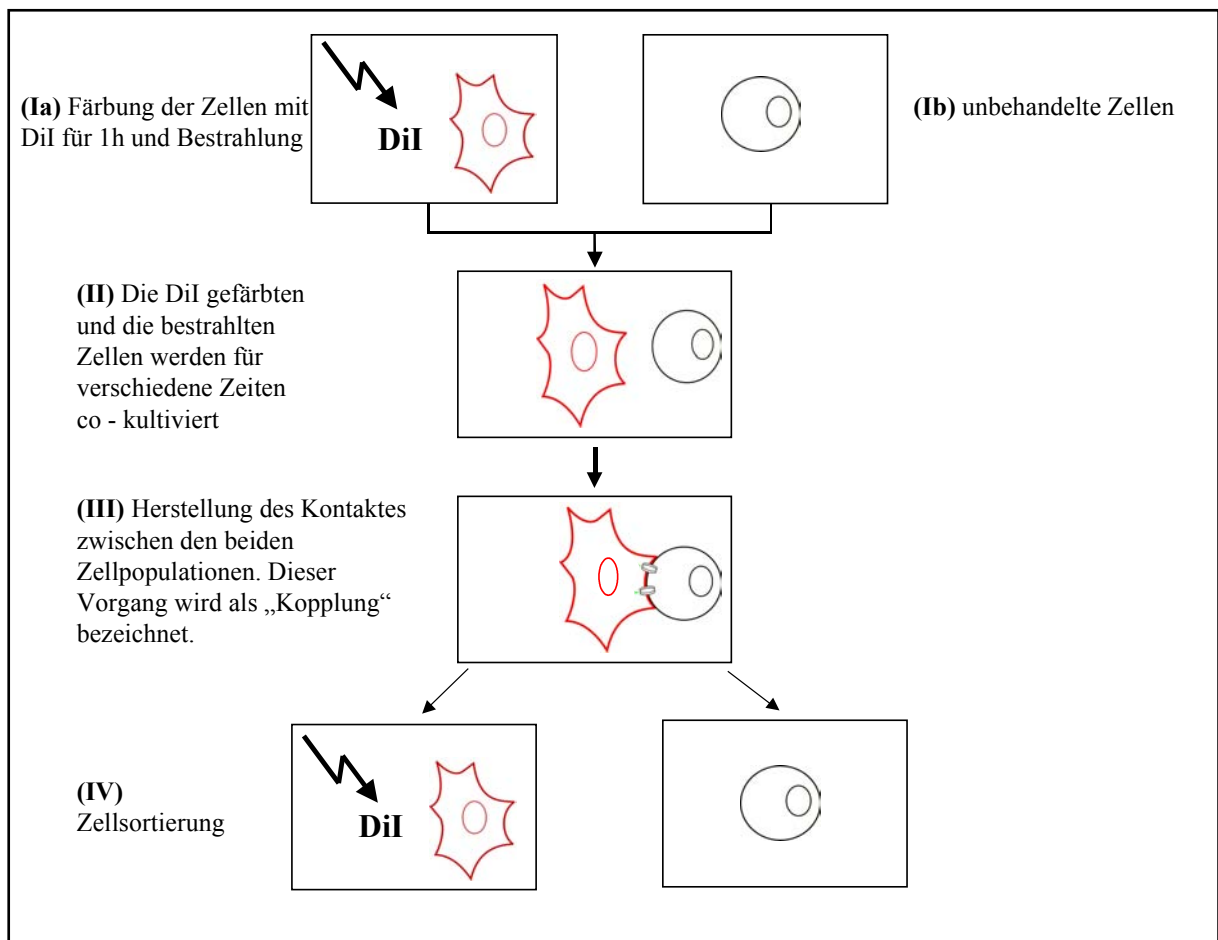


Abb. 47: Methode zur Untersuchung von „bystander“-Effekten: „bystander“ Zellen werden mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert und durch anschließendes „Zellsorting“ wieder voneinander getrennt. Genaue Erklärungen im Text.

Bei dieser Methode können die gefärbten und bestrahlten Zellen durch Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™ (vgl. 2.12) von den unbehandelten „bystander“-Zellen nach der Co-Kultivierung wieder getrennt werden. Die Reaktion der unbehandelten „bystander“-Zellen kann sowohl nach Bestrahlung unter niedrig als auch nach Bestrahlung unter hoch LET Bedingungen untersucht werden. Die Beteiligung der gap junction

vermittelten interzellulären Kommunikation an der Entwicklung von „bystander“-Effekten kann aufgrund des Co-Kultivierungssystems ebenfalls untersucht werden.

Mit dieser Verfahrenstechnik eröffnet sich ein neuer Weg zur Untersuchung von „bystander“-Effekten und dadurch erhöhen sich die experimentellen Möglichkeiten.

In Abbildung 48 A ist der Zellsorter EPICS® Altra™ der Firma Beckman Coulter dargestellt. Abbildung 48 B zeigt eine Vergrößerung der Probenkammer. Die Zellen befinden sich vor dem Sortiervorgang in einer verdünnten Messsuspension. Während des Sortierens werden die Zellen aufgrund von ausgewählten Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften voneinander getrennt und zur Anreicherung in Reagenzröhrchen aufgefangen (vgl. 2.12).

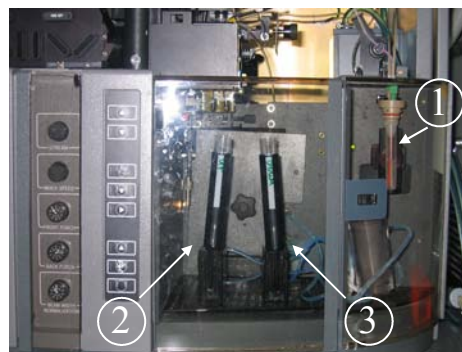
A**B**

Abb. 48: EPICS® Altra™ von Beckman Coulter, **A** Übersicht über den gesamten Zellsorter, **B** vergrößerte Darstellung der Probenkammer, (1) die Zellen befinden sich vor dem sortieren in einer verdünnten Messsuspension in einem Flowzytometer Tube, anschließend erfolgt die Trennung der Zellen in (2) bestrahlte und DiI gefärbte Zellpopulation und (3) „bystander“ Zellpopulation

3.5 Untersuchung von „bystander“-Effekten in verschiedenen Zelllinien

Mit Hilfe der in 3.4.1 beschriebenen Methode ist es möglich, „bystander“-Effekte in unbestrahlten Zellen zu untersuchen. „Bystander“-Effekte können durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, wobei zur Untersuchung eines jeden Mechanismus ein anderer Endpunkt gewählt wird. Die hier untersuchten Endpunkte sind die Phosphorylierung des p53 Proteins und der G₂-Block, die bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben wurden (vgl. 1.7 und 1.8).

In dieser Arbeit sollten nicht nur „bystander“-Effekte analysiert werden, sondern auch welche Rolle die gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation bei der

Entwicklung von „bystander“-Effekten spielt. Daher wurde als erstes eine Zelllinie verwendet, die in der Lage ist, über gap junctions zu kommunizieren. Die Zelllinie b-End exprimiert die Connexine Cx 37, Cx 40 und Cx 43, die für die Ausbildung von gap junctions benötigt werden (vgl. 2.7.2).

3.5.1 Die Maus-Endothelzelllinie b-End

Mit der in Kapitel 3.2.1 etablierten Methode, wurde für die Zelllinie b-End ein Kopplungsgrad von 97% ermittelt. Für die Untersuchung von „bystander“-Effekten in den b-End Zellen, wurden diese sowohl mit 5 Gy Röntgenstrahlen als auch mit 3 Gy Neutronen bestrahlt.

A Ergebnisse nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen

Für dieses Experiment wurde zunächst eine Zellpopulation mit DiI gefärbt und mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (vgl. 2.9). Anschließend wurde diese Zellpopulation trypsinisiert und auf unbestrahlte Zellen gegeben (vgl. 2.13). Die Zellkulturen wurden für 1h, 2h, 4h, 8h und 24h co-kultiviert und im Anschluss durch Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™ (vgl. 2.12) wieder voneinander getrennt. Mit Hilfe der Western Blot Analyse (vgl. 2.8.4) wurde spezifisch die Induktion von phosphoryliertem p53 sowohl in bestrahlten und DiI gefärbten Zellen, als auch in den „bystander“ Zellen gemessen. In Abbildung 49 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

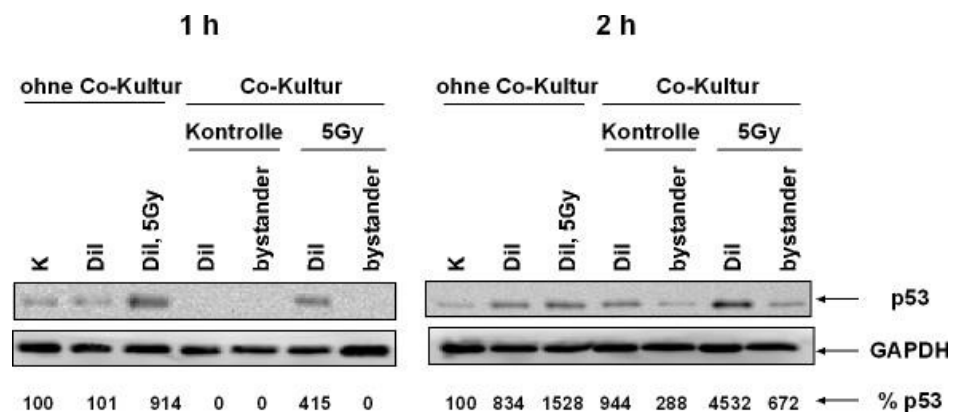


Abb. 49 A: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in b-End Zellen. Die DiI gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgen bestrahlt und für unterschiedliche Zeitpunkte co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Abkürzung: K: Kontrolle.

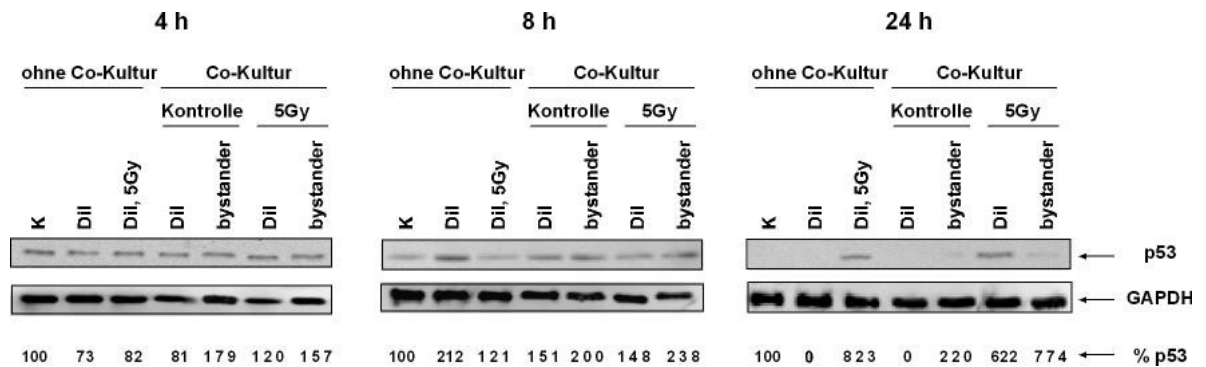


Abb. 49 B: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in b-End Zellen. Die DiI gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgen bestrahlt und für unterschiedliche Zeitpunkte co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Abkürzung: K: Kontrolle.

Bereits 1h nach Bestrahlung wird p53 phosphoryliert. Die bestrahlten und DiI gefärbten Zellen zeigen sowohl ohne als auch nach Co-Kultivierung 1h nach der Bestrahlung eine stärkere Zunahme an phosphoryliertem p53. 2h und 4h nach der Bestrahlung ist in allen Ansätzen phosphoryliertes p53 detektierbar. Das lässt darauf schließen, dass die Zellen Stress ausgesetzt waren, der zu einer Zunahme an phosphoryliertem p53 geführt hat. In den „bystander“ Zellen, die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, ist ebenfalls phosphoryliertes p53 nachweisbar. Allerdings kann man einen „bystander“-Effekt ausschließen, da die DiI gefärbten Zellen zu diesen Zeitpunkten ebenfalls eine erhöhte Menge an phosphoryliertem p53 aufweisen. 4h nach der Bestrahlung ist die Menge an phosphoryliertem p53 in den „bystander“ Zellen sogar höher als in den direkt bestrahlten Zellen. Nach 24h ist nur noch in den bestrahlten Ansätzen phosphoryliertes p53 nachweisbar.

Ein weiterer Endpunkt der nach Co-Kultur der Zellen untersucht wurde, war die Zellzyklusverteilung der Zellen (vgl. 2.14). Die Analyse der Proben erfolgte mittels Flow Cytometrie (vgl. 2.10). In Abbildung 50 sind beispielhaft DNA-Histogramme von Zellpopulationen ohne Co-Kultur dargestellt.

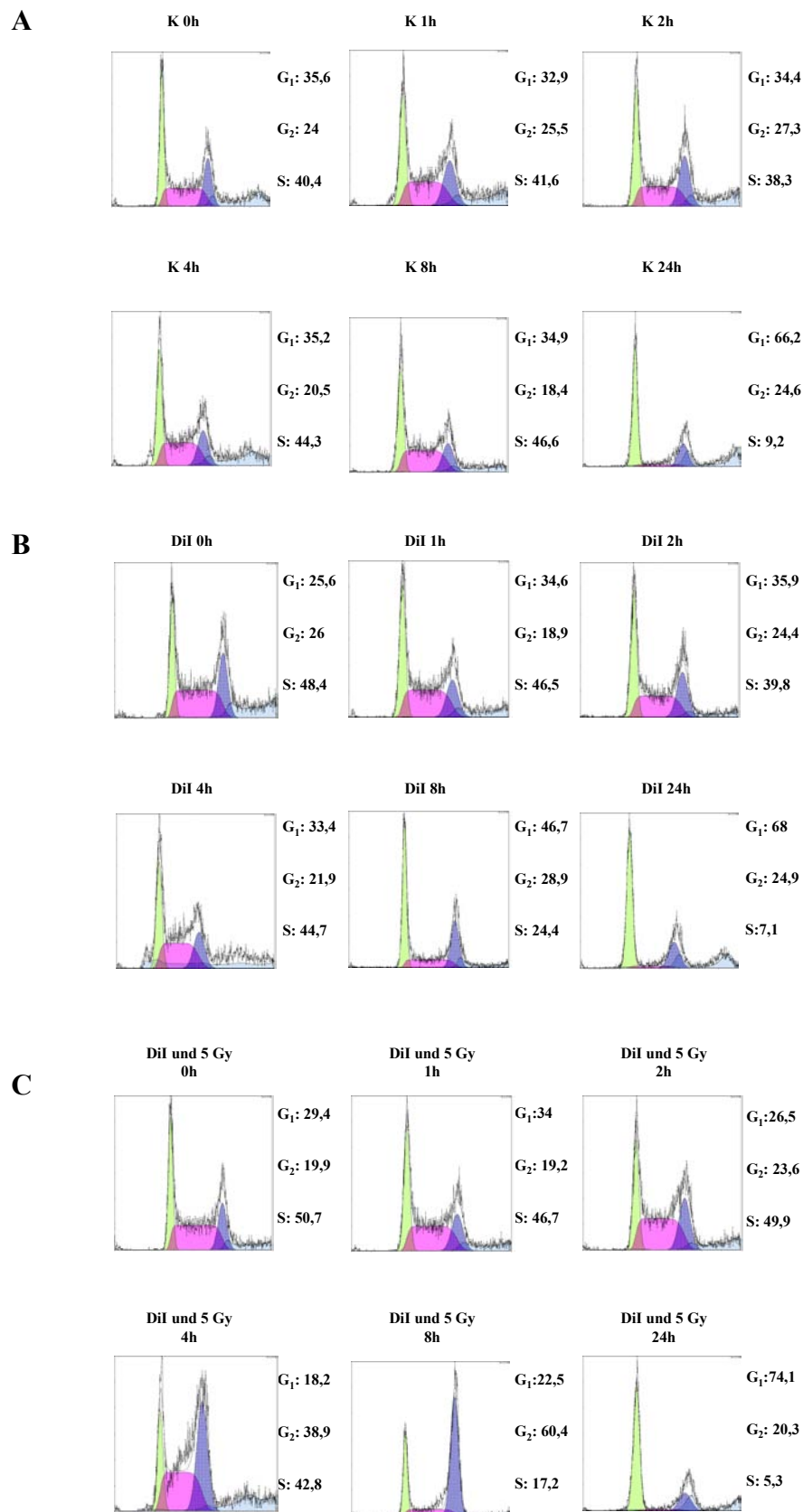


Abb.50: DNA Histogramme von b-End Zellen ohne Co-Kultur. Zell-Zyklus-Verteilung von (A) unbestrahlten Zellen, (B) von DiI gefärbten Zellen und (C) mit 5 Gy bestrahlten und DiI gefärbten Zellen. Unter Angabe der Zell –Zyklus-Verteilung in %.

Die Abbildung zeigt die Zell-Zyklus-Verteilung aus drei verschiedenen Ansätzen. Im ersten Ansatz wurden die Zellen weder bestrahlt noch mit DiI gefärbt (Abb. 50 A). In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen nur mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI gefärbt (Abb. 50 B). Die Zellen aus dem dritten Ansatz wurden erst mit DiI gefärbt und anschließend mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt (Abb. 50 C).

Wie aus dem Vergleich der DNA-Histogramme hervorgeht, hat die Färbung der Zellen mit DiI (Abb. 50 B) keinen Einfluß auf den Zellzyklus. Die DiI gefärbten Zellen zeigen eine ähnliche Verteilung der Zellzyklusphasen wie die unbehandelten Zellen (Abb. 50 A). Werden die Zellen zusätzlich zur Färbung mit DiI noch mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt, dann werden die Zellen bereits 4h nach der Bestrahlung in der G₂-Phase gestoppt (Abb. 50 C). In Abbildung 51 ist die zeitliche Verteilung der G₂-Phase ohne Co-Kultivierung der Zellen zusammenfassend dargestellt.

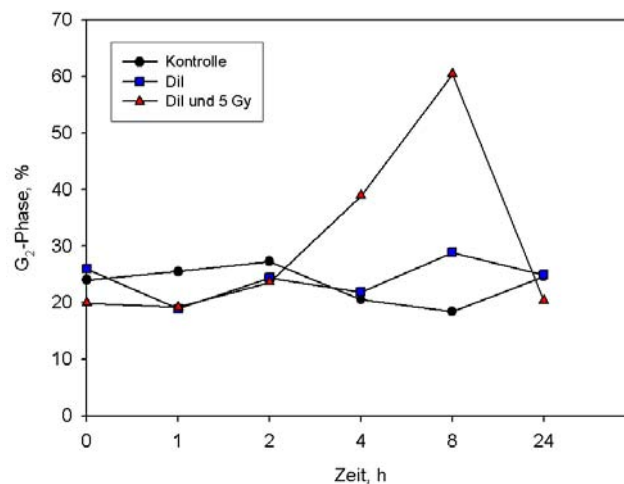


Abb. 51: Prozentualer Anteil der G₂-Phase von b-End Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

4h nach der Bestrahlung zeigen die Zellen bereits einen leichten G₂-Block. Der G₂ Anteil ist 8h nach Bestrahlung auf 60,4% gestiegen und hat damit sein Maximum erreicht. Nach 24 h sinkt der Anteil der G₂-Zellen wieder auf 20,3%. Direkt nach der Bestrahlung lag der Anteil an G₂ bei 19,9%. Daraus folgt, dass die Zellen 24h nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wieder in den Ausgangszustand zurückgekehrt sind. Der Anteil der G₂-Phase liegt bei den DiI gefärbten Zellen um 24,2% ± 3,4%. Da die ungefärbten und unbestrahlten Zellen einen G₂-Anteil um 23,4% ± 3,3% aufweisen, hat die Färbung der Zellen mit DiI keinen Einfluss auf den Zellzyklus.

Für die Co-Kultur Experimente wurden 2 Ansätze hergestellt. Im ersten Ansatz wurden die DiI gefärbten b-End Zellen mit unbehandelten b-End Zellen für verschiedene Zeitpunkte co-kultiviert. Eine Bestrahlung der Zellen fand hier nicht statt. Abbildung 52 A zeigt die beispielhaft die DNA-Histogramme der Zellpopulationen nach Co-Kultur. Im zweiten Ansatz wurden die DiI gefärbten b-End Zellen mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und anschließend mit unbehandelten b-End Zellen für verschiedene Zeitpunkte co-kultiviert. In Abbildung 52 B sind beispielhaft die DNA-Histogramme der Zellpopulationen nach Co-Kultur zusammengestellt.

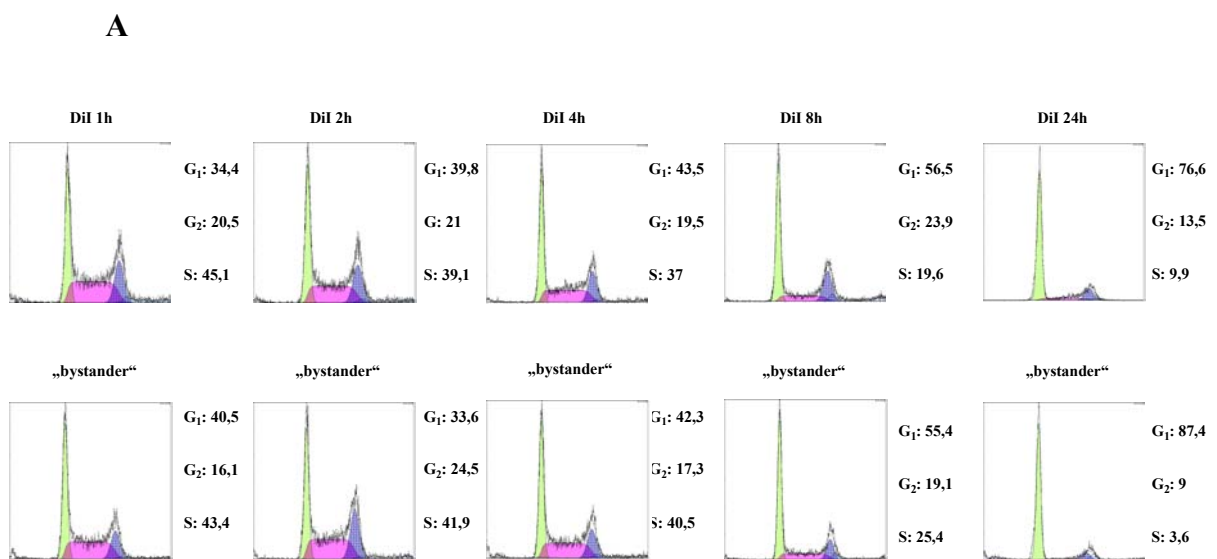


Abb. 52 A: DNA-Histogramme von DiI gefärbten b-End Zellen und unbehandelten b-End Zellen nach Co-Kultur. Die beiden Zellpopulationen wurden für die gezeigten Zeitpunkte co-kultiviert. Im Anschluß wurden die beiden Zellpopulationen durch Zellsortierung wieder voneinander getrennt. Nach Fixierung der Zellen erfolgte die Färbung mit PI. Die gefärbten Zellen wurden im Flow Cytometer analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Phasen im Zellzyklus.

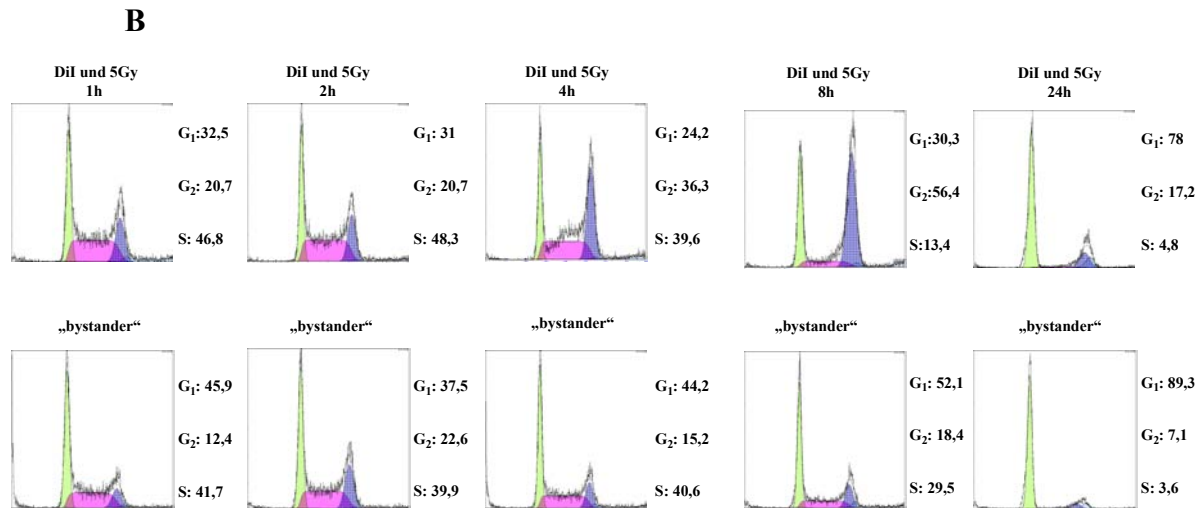


Abb. 52 B: DNA-Histogramme von DiI gefärbten und bestrahlten (5Gy) b-End Zellen nach Co-Kultur mit unbehandelten b-End Zellen. In diesem Versuchsansatz wurden die DiI gefärbten Zellen mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und anschließend mit unbehandelten „bystander“ Zellen für die gezeigten Zeitpunkte co-kultiviert.

Die DNA-Histogramme der DiI gefärbten Zellen nach Co-Kultur mit unbehandelten Zellen (Abb. 52 B), zeigen eine ähnliche Verteilung im Zellzyklus, wie die DiI gefärbten Zellen ohne Co-Kultur (Abb. 50 A). Demnach hat die Co-Kultivierung mit einer anderen Zellpopulation keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. Nach 24h Co-Kultur gehen die Zellen in ein Plateau über. Das lässt sich damit erklären, dass bei den Co-Kultur Experimenten dreimal mehr Zellen in einer Petrischale sind.

Die „bystander“ Zellen zeigen auch keine Veränderung in der Verteilung des Zellzyklus. Auch hier lässt sich ein Einfluss der Co-Kultivierung auf den Zellzyklus ausschließen. Das zeigt ein Vergleich mit den DNA-Histogrammen der unbehandelten Zellen ohne Co-Kultivierung (Abb. 50 A).

Die DiI gefärbten und bestrahlten b-End Zellen (Abb. 52 B) zeigen nach 4h eine Zunahme im G₂-Anteil. Der G₂-Block erreicht nach 8h sein Maximum. Ohne Co-Kultivierung zeigen die DiI gefärbten und bestrahlten Zellen dieselbe Verteilung (Abb. 50 C). Nach 24h nimmt der Anteil der G₂-Phase wieder ab. Die „bystander“ Zellen die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, zeigen keine Veränderung im Zellzyklus. Das wird deutlich beim Vergleich mit den DNA-Histogrammen der „bystander“ Population aus dem unbestrahlten Ansatz (Abb. 52 A). Im Bezug auf den G₂-Anteil konnte in den „bystander“ Zellen nach Co-Kultivierung mit bestrahlten Zellen kein Effekt nachgewiesen werden. Auch in diesem Ansatz gehen die Zellen nach 24h in ein Plateau über.

In Abbildung 53 ist die Verteilung des G₂-Phase Anteils nach Co-Kultivierung von behandelten b-End Zellen mit unbehandelten b-End Zellen gegen die Zeit graphisch zusammengefasst.

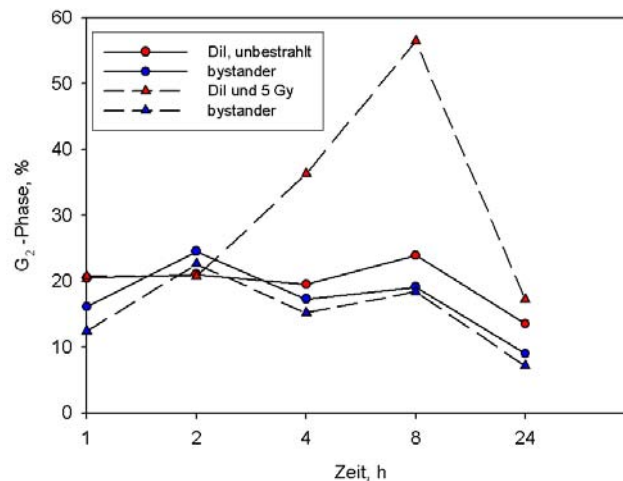


Abb. 53: Prozentualer Anteil der G₂-Phase in b-End Zellen gegen die Zeit nach Co-Kultivierung. Die DiI gefärbten b-End Zellen (roter Kreis) wurden mit den unbehandelten „bystander“ b-End Zellen (blauer Kreis) für die gezeigten Zeitpunkte co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Die DiI gefärbten und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten b-End Zellen werden in der Abbildung durch ein rotes Dreieck symbolisiert. Diese Zellpopulation wurde mit den unbehandelten „bystander“ b-End Zellen (blaues Dreieck) für die gezeigten Zeitpunkte co-kultiviert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

B Ergebnisse nach Bestrahlung mit 3 Gy Neutronen

Um zu untersuchen, ob es unter dem Einfluss von hoch LET Strahlung ebenfalls zu einer Induktion von phosphoryliertem p53 in den „bystander“ Zellen kommt, wurden die b-End Zellen mit 3 Gy Neutronen bestrahlt (vgl. 2.9.2). Anschließend wurden diese Zellpopulation trypsiniert und auf unbehandelte und unbestrahlte Zellen gegeben (vgl. 2.13). Die Zellkulturen wurden für 1h, 2h, 4h, 8h und 24h co-kultiviert und im Anschluss durch Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™ (vgl. 2.12) wieder voneinander getrennt. Mit Hilfe der Western Blot Analyse (vgl. 2.8.4) wurde spezifisch die Induktion von phosphoryliertem p53 sowohl in bestrahlten und DiI gefärbten Zellen, als auch in den „bystander“ Zellen gemessen. Abbildung 54 fasst die Ergebnisse zusammen.

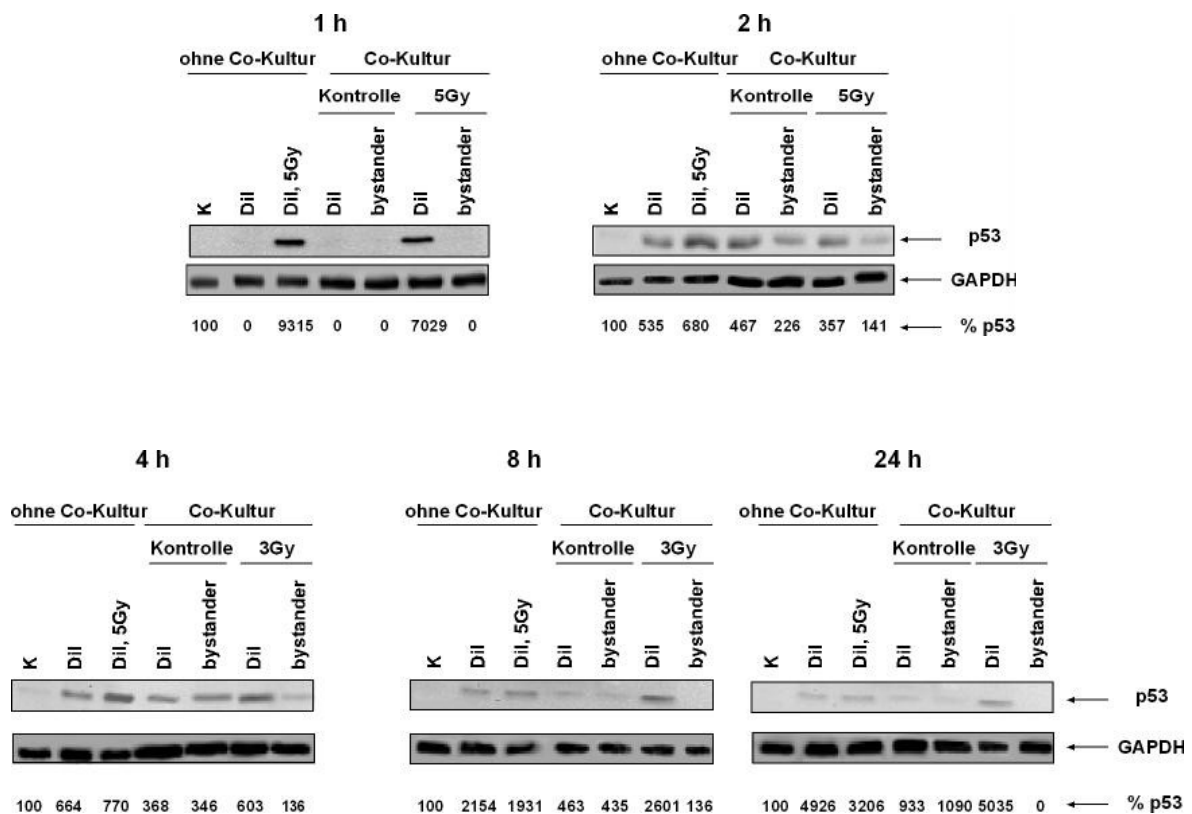


Abb. 54: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in b-End Zellen. Die DiI gefärbten Zellen wurden mit 3 Gy Neutronen bestrahlt und für unterschiedliche Zeitpunkte co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Abkürzungen: K: Kontrolle.

Die bestrahlten und DiI gefärbten Zellen zeigen sowohl ohne als auch nach Co-Kultivierung 1h nach der Bestrahlung eine Zunahme an phosphoryliertem p53. Nach einer Stunde ist bereits das Maximum erreicht. 2h nach der Bestrahlung ist auch in den DiI gefärbten Zellen, die nicht bestrahlt wurden, phosphoryliertes p53 detektierbar. Es scheint so, als hätte auch die Färbung mit DiI einen Einfluss auf die Phosphorylierung des p53. In den „bystander“ Zellen, die mit der bestrahlten Population co-kultiviert wurden, ist 2h nach Versuchsbeginn ebenfalls phosphoryliertes p53 nachweisbar. Ein „bystander“ Effekt dieser unbehandelten Population ist auszuschließen, da in den „bystander“ Zellen, die mit den unbestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, auch ein p53 Signal detektierbar ist. Die Phosphorylierung von p53 in den nicht bestrahlten Zellen könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Zellen während des Experimentes erhöhtem Stress ausgesetzt waren.

Auch nach der Bestrahlung mit Neutronen erfolgte eine Analyse des Zellzyklus. In Abbildung 55 sind die prozentualen Anteile der G₂-Phase gegen die Zeit nach Bestrahlung mit 3 Gy Neutronen aufgetragen. In dem Diagramm sind die G₂-Phasen aus drei verschiedenen Ansätzen gezeigt. Im ersten Ansatz wurden die b-End Zellen weder bestrahlt noch mit DiI gefärbt. In einem zweiten Ansatz wurden die b-End Zellen nur mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI gefärbt. Die b-End Zellen aus dem dritten Ansatz wurden erst mit DiI gefärbt und anschließend mit 3 Gy Neutronen bestrahlt. Eine Co-Kultivierung der Zellen mit einer anderen Zellpopulation fand in diesen Ansätzen nicht statt.

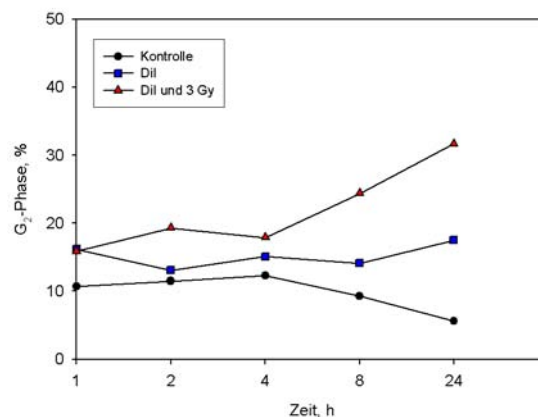


Abb. 55: Prozentualer Anteil der G₂-Phase in b-End Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

Die G₂-Verteilung nach Bestrahlung mit Neutronen ist ähnlich der Verteilung nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. 8h nach der Bestrahlung zeigen die b-End Zellen eine deutliche Zunahme des G₂-Anteils. Im Gegensatz zur Bestrahlung der b-End Zellen mit Röntgenstrahlen, setzt der G₂-Block nach Bestrahlung der Zellen mit Neutronen verzögert ein und dauert länger an. Auch 24h nach der Bestrahlung ist der Anteil der G₂-Phase nicht auf den Ausgangswert zurückgegangen.

In Abbildung 56 ist die Verteilung der G₂-Phase Zellen nach Co-Kultivierung von bestrahlten bzw. unbestrahlten DiI gefärbten Zellen mit unbehandelten „bystander“ Zellen gezeigt. Die unbehandelten „bystander“ Zellen, die mit bestrahlten bzw. unbestrahlten DiI gefärbten Zellen co-kultiviert wurden, sind im Diagramm blau dargestellt.

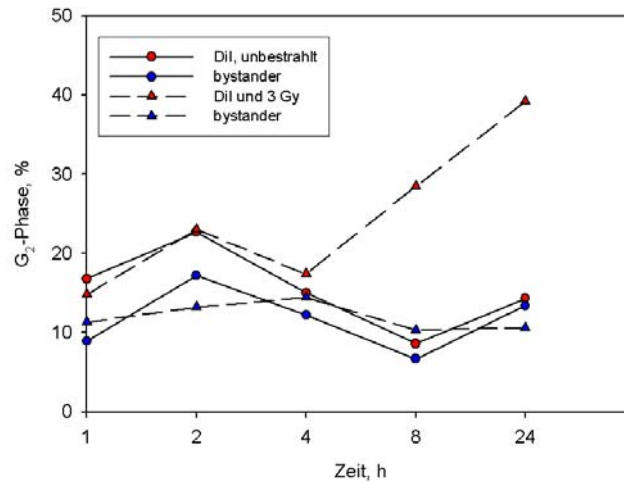


Abb. 56: Prozentualer Anteil der G₂-Phase in b-End Zellen gegen die Zeit nach Co-Kultivierung. Die DiI gefärbten b-End Zellen (roter Kreis) wurden mit den unbehandelten „bystander“ b-End Zellen (blauer Kreis) für die gezeigten Zeitspannen co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Die DiI gefärbten und mit 3 Gy Neutronen bestrahlten b-End Zellen, werden in der Abbildung durch ein rotes Dreieck symbolisiert. Diese Zellpopulation wurden mit den unbehandelten „bystander“ b-End Zellen (blaues Dreieck) für die gezeigten Zeitspannen co-kultiviert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

Die DiI gefärbten und mit 3 Gy Neutronen bestrahlten b-End Zellen (rotes Dreieck), zeigen nach Co-Kultivierung mit unbehandelten Zellen (blaues Dreieck) dieselbe Verteilung der G₂-Phase wie die behandelten Zellen ohne Co-Kultivierung (Abb. 55). 8h nach Bestrahlung ist eine deutlich erhöhte Anzahl von Zellen in der G₂-Phase nachweisbar. Nach 24h hat der G₂-Block sein Maximum erreicht. Die „bystander“ Zellen (blaues Dreieck), die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, weisen keine Veränderung in der G₂-Phase auf. Der G₂ Anteil liegt in der „bystander“ Population bei einen Wert von 12% ±1,8%. Eine ähnliche Verteilung der G₂-Phase zeigen auch die „bystander“ Zellen, die mit den unbestrahlten, DiI gefärbten b-End Zellen co-kultiviert wurden. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase liegt hier bei 11,7% ±4,1%.

Zusammenfassend kann für die Zelllinie b-End festgestellt werden, dass weder nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (niedrig LET), noch nach Bestrahlung mit

Neutronen (hoch LET) mit dieser Methode ein „bystander“-Effekt bezüglich eines G₂-Blocks bzw. einer Phosphorylierung von p53 nachzuweisen ist.

3.5.2 Die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3

Diese Zelllinie ist im Gegensatz zu den b-End Zellen kommunikationsdefizient, da dieser Zelllinie die für die Ausbildung von gap junctions nötigen Connexine fehlen (vgl. 2.7.2). Für diese Zelllinie wurden die „bystander“-Effekte, wie bereits unter 3.5.1 für die b-End Zellen beschrieben, untersucht. Allerdings erfolgte die Analyse bei dieser Zelllinie nur nach Bestrahlung mit niedrig LET. Da bei den b-End Zellen keine „bystander“-Effekte im Bezug auf den G₂-Block bzw. die Phosphorylierung von p53 aufgetreten sind, wurden hier die Zellen nur 4 und 8 h nach Co-Kultivierung analysiert. In Abbildung 57 ist die Analyse von p53 mittels Western Blot dargestellt.

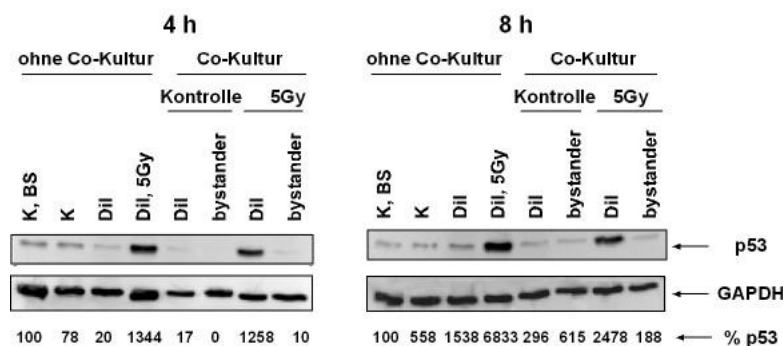


Abb. 57: Western Blot Analyse von phosphoryliertem p53 in Jeg 3 Zellen. Die DiI gefärbten Jeg3 Zellen wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und für unterschiedliche Zeitpunkte co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Abkürzungen: K: Kontrolle, BS: Kontrollzellen, die nur im Brutschrank waren; K: Kontrolle

Die bestrahlten und DiI gefärbten Zellen zeigen sowohl ohne als auch nach Co-Kultivierung 4h nach der Bestrahlung eine Zunahme an phosphoryliertem p53. Auch nach 8h ist das Signal immer noch nachweisbar. Auch in den Kontrollen und in den DiI gefärbten Jeg3 Zellen ist phosphoryliertes p53 detektierbar. Die „bystander“ Zellen, die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, zeigen dagegen kein Signal. Zwar ist nach 8h bei den „bystander“ Zellen eine schwache Bande erkennbar, die aber auch in den Kontrollzellen auftritt und nicht für einen „bystander“-Effekt spricht.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse sind in einer Graphik dargestellt, in der sowohl ein Versuchsansatz ohne Co-Kultivierung der Jeg3 Zellen (Abb. 58 A) als auch das Ergebnis nach Co-Kultivierung (Abb. 58 B) aufgeführt wurden.

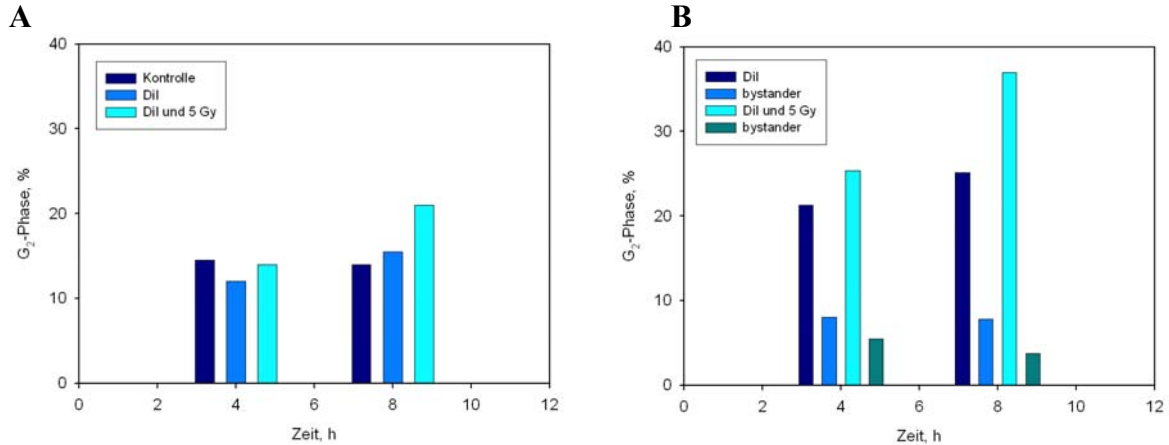


Abb. 58: A Prozentualer Anteil der G₂-Phase in Jeg3 Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden nach 4h und 8h fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

B Prozentualer Anteil der G₂ – Phase in Jeg3 Zellen gegen die Zeit nach Co-Kultivierung Die DiI gefärbten Jeg3 Zellen (blauer Balken) wurden mit den unbehandelten „bystander“ Jeg3 Zellen (hellblauer Balken) für die gezeigten Zeitspannen co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Die DiI gefärbten und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Jeg3 Zellen, werden in der Abbildung durch einen cyanblauen Balken symbolisiert. Diese Zellpopulation wurden mit den unbehandelten „bystander“ Jeg3 Zellen (grüner Balken) für die gezeigten Zeitspannen co-kultiviert. Die Zellen wurden nach 4h und 8h mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

Die Bestrahlung der Jeg3 Zellen führt nach 8h dazu, dass sich eine deutlich erhöhte Anzahl der Zellen in der G₂-Phase befindet (58 A). Die Färbung der Jeg3 Zellen mit DiI beeinflusst die G₂-Phase nicht. In Abbildung 58 B ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G₂-Phase nach Co-Kultivierung mit den unbehandelten „bystander“ Zellen gezeigt. Auch bei den bestrahlten und DiI gefärbten Jeg3 Zellen befindet sich nach 8h eine erhöhte Anzahl Zellen in der G₂-Phase (58 B). Auf die Verteilung der G₂-Phase in den „bystander“ Zellen hat die Co-Kultur mit den bestrahlten Jeg3 Zellen jedoch keinen Einfluss.

Die Untersuchung des Klons Cx43/102 aus der Zelllinie Jeg3 ergab ebenfalls keine Hinweise auf eine Phosphorylierung des p53 in den „bystander“ Zellen. Bei diesem Klon handelt es sich um einen Connexin Transfektanten (Cx43 und Cx26) der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 unter der Kontrolle eines tet-on Systems (vgl. 2.7.2). Wenn dieser Klon mit Doxyzyklin behandelt wird, ist er in der Lage mit Hilfe der transfizierten Connexine gap junctions auszubilden und somit zu kommunizieren. In Abbildung 59 sind die Dot-plot-Histogramme von der Kopplung des Klons Cx43/102 gezeigt.

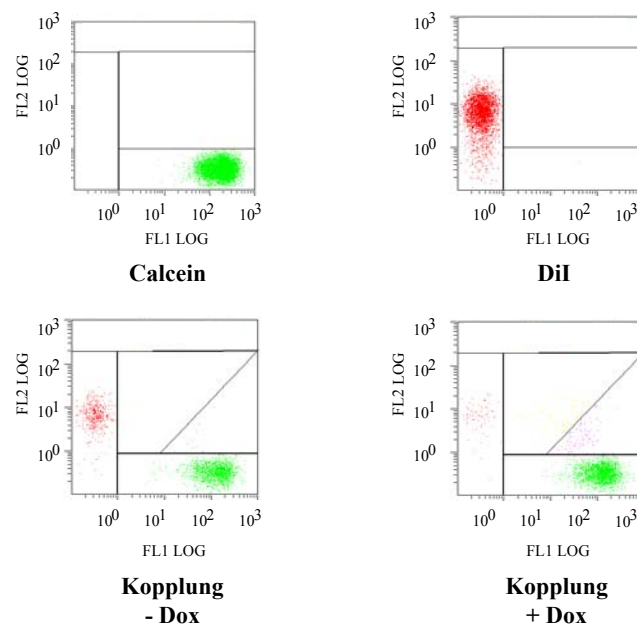


Abb. 59: Dot-plot-Histogramme des Klons Cx43/102 aus der Zelllinie Jeg3. Dargestellt sind die Calcein gefärbten Cx43/102 Jeg3 Zellen. Die mit Calcein gefärbten Donorzellen zeichnen sich durch eine hohe Grün-Fluoreszenz im FL-1 Kanal aus und sind dementsprechend im Dot-plot-Histogramm grün dargestellt. Der dot plot der DiI gefärbten Akzeptorzellen zeigt eine starke rote Fluoreszenz im FL-2 Kanal. Daher wurden die DiI gefärbten Cx43/102 Jeg3 Zellen im Dot-plot-Histogramm rot dargestellt. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Kopplungen jeweils ohne/ mit Induktion durch Doxyzyklin (-/+ Dox) gezeigt. Eine Zellkopplung zwischen den beiden Populationen, ist im Dot-plot-Histogramm mit der Farbe gelb gekennzeichnet. Die violetten Zellen symbolisieren den Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf Calcein gefärbte Zellen.

Die Kopplungseffizienz wurde nach der in Kapitel 2.11 beschriebenen Formel berechnet und liegt nach der Behandlung mit Doxyzyklin bei 74% (Abb. 59). Wenn die Zellen vor der Kopplung nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden, findet keine Kopplung zwischen den Zellen statt.

gefärbten, bestrahlten Jeg3 Cx43/102 Zellen co-kultiviert wurden, zeigen dagegen keine Phosphorylierung des p53. Die Verteilung des Zellzyklus wurde für den Klon Jeg3 Cx43/102 nicht untersucht.

3.5.3 Die Haut-Fibroblastenzelllinie AG 1522

Theoretischer Hintergrund für die Verwendung dieser Zelllinie:

Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung der AG 1522 Fibroblasten mit niedrig LET, zu einer Induktion von „bystander“-Effekten in den unbehandelten Zellen AG 1522 führt. Die bestrahlten Zellen wurden in dieser Versuchsanordnung von den unbestrahlten „bystander“-Zellen durch eine permeable Membran getrennt. Die beiden Zellpopulationen befanden sich im selben Medium, jedoch ohne direkten Kontakt. Eine Untersuchung der unbestrahlten „bystander“-Zellen ergab eine Erhöhung der Mikronukleusfrequenz, sowie eine Induktion von p21^{WAF1} und eine Zunahme von γ -H₂ AX Foci.

Diese Zelllinie, ist ebenso wie die b-End Zellen, in der Lage, über gap junctions zu kommunizieren. Die Messung des Kopplungsgrades mittels „FACS“ (vgl. 2.11), ergab eine Kopplungseffizienz von 86%. Da für diese Zelllinie nach Co-Kultur mit bestrahlten Zellen ein „bystander“-Effekt gezeigt werden konnte, wurden die AG 1522 Fibroblasten ebenfalls mit Hilfe des entwickelten Co-Kultursystems (vgl. 3.4.1) untersucht. Für die Untersuchung von „bystander“-Effekten wurde zunächst eine AG 1522 Zellpopulation mit DiI gefärbt und mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (vgl. 2.9). Anschließend erfolgte die Co-Kultur mit unbehandelten Zellkulturen für 1h, 2h, 4h und 8h. Nach Trennung der Populationen mit dem EPICS® Altra™ (vgl. 2.12), wurde die spezifische Induktion von phosphoryliertem p53 sowohl in bestrahlten und DiI gefärbten Zellen, als auch in den bystander Zellen mittels Western Blot Analyse (vgl. 2.8.4) gemessen. Der Western Blot ist in Abbildung 61 gezeigt.

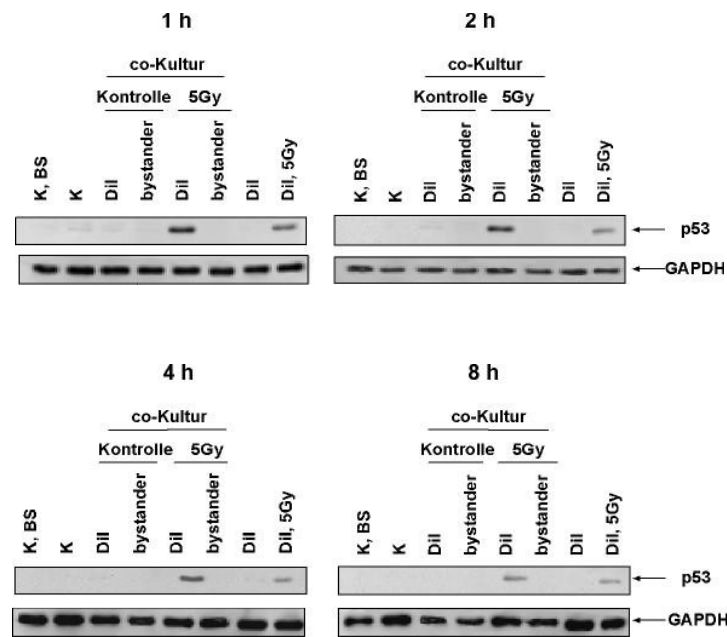


Abb. 61: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in AG1522 Zellen. Die Dil gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und für 1h, 2h, 4h und 8h mit unbehandelten AG1522 co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Abkürzungen: K, BS: Kontrollzellen, die nur im Brutschrank waren; K: Kontrolle.

Die Analyse ergab eine Phosphorylierung des p53 in den bestrahlten Zellen, sowohl ohne als auch nach Co-Kultivierung mit anderen Zellen. Das Signal hat bereits 1h nach Bestrahlung sein Maximum erreicht und nimmt im Verlauf der Zeit ab. Sowohl die Dil gefärbten Zellen, als auch die unbehandelten Kontrollen zeigen keine Phosphorylierung des p53. Auch in den „bystander“ AG 1522 Zellen, die mit den bestrahlten AG 1522 Zellen co-kultiviert wurden, konnte kein p53 Signal detektiert werden. Bei der Analyse der Zellzyklusverteilung konnte ebenfalls keine Veränderung der G₂-Phase in den „bystander“ Zellen festgestellt werden.

3.5.4 Die Glioblastoma Zelllinie T98G

Theoretischer Hintergrund für die Verwendung dieser Zelllinie:

Experimente mit partieller Bestrahlung haben gezeigt, dass es zu einer signifikanten Zunahme der Mikronukleusanzahl in den unbehandelten „bystander“ T98G Zellen kommt. In dieser Versuchsanordnung wurden zunächst die AG 1522 Zellen mit 1 oder 5 Helium Partikeln ($^3\text{He}^{2+}$) bestrahlt. Die bestrahlten AG1522 Zellen wurden dann für 24h mit den unbehandelten T98G Zellen co-kultiviert. Dabei zeigten die unbehandelten „bystander“

T98G Zellen eine Erhöhung der Hintergrundfrequenz von Mikronuklei bezogen auf die Kontrollen um 28%. Bestrahlt man dagegen die T98G Zellen und kultiviert sie mit unbehandelten „bystander“ AG1522 Zellen, zeigen die „bystander“ AG1522 Zellen eine Erhöhung der Anzahl von Mikronuklei um 79%.

Die nächste Zelllinie, die auf „bystander“-Effekte untersucht wurde, war die menschliche Glioblastoma Zelllinie T98G (vgl. 2.7.2). Diese Zelllinie ist, ebenso wie die Jeg3 Zellen, nicht in der Lage, über gap junctions zu kommunizieren. Die Messung des Kopplungsgrades mittels „FACS“ (vgl. 2.11), ergab nach 4h Kopplungszeit eine Kopplungseffizienz von 18%. Im folgenden sollte untersucht werden, ob die T98G Zellen „bystander“-Effekte nach Bestrahlung mit niedrig LET zeigen.

Ein Endpunkt, der in den „bystander“ T98G Zellen nach Co-Kultivierung mit bestrahlten T98G Zellen untersucht wurde, war die Induktion von phosphorylierten p53 (vgl. 2.8.4). Darüber hinaus wurde untersucht, ob es in den „bystander“ T98G Zellen zu einer Veränderung im Zellzyklus kommt (vgl. 2.14). Abbildung 62 zeigt die Ergebnisse für die Induktion von phosphoryliertem p53. Da die T98G Zellen ein Wildtyp *p53* (*wtp53*) Gen besitzen, zeigen auch die unbehandelten T98G Zellen ohne Co-Kultivierung ein p53 Signal. Um feststellen zu können, ob in den „bystander“ T98G Zellen mehr phosphoryliertes p53 vorliegt als in den unbehandelten Kontrollen, wurde der Western Blot quantifiziert (Quantity One, Bio-Rad).

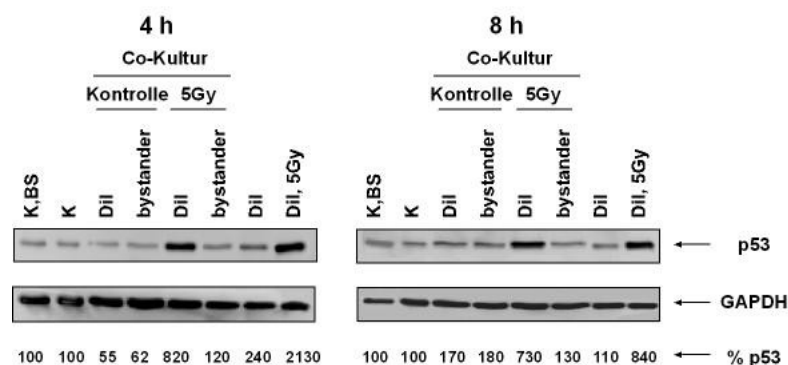


Abb. 62: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in T98G Zellen. Die Dil gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgen bestrahlt und für 4h und 8h mit unbehandelten T98G Zellen co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Abkürzungen: K, BS: Kontrollzellen die nur im Brutschrank waren; K: Kontrolle.

Die DiI gefärbten und bestrahlten T98G Zellen zeigen 4h nach Versuchsbeginn eine 21fach höhere Expression von p53 als die unbehandelten Kontrollen bzw. die DiI gefärbten T98G Zellen. Auch nach Co-Kultur mit unbehandelten T98G Zellen, zeigen die DiI gefärbten und bestrahlten Zellen eine erhöhte Expression von p53. Allerdings ist hier die Expression von p53 nur achtmal höher (Abb. 62). Eine Induktion von p53 in den „bystander“ Zellen als Folge der Co-Kultivierung mit den bestrahlten Zellen, ist nicht erkennbar. Die „bystander“ Zellen, die mit den bestrahlten T98G Zellen co-kultiviert wurden, weisen zweimal mehr phosphoryliertes p53 auf, als die „bystander“ Zellen als dem unbestrahlten Kontrollansatz. Die Kontrollen die nicht behandelt oder mit einer anderen Zellpopulation co-kultiviert wurden, enthalten genauso viel phosphoryliertes p53. 8h nach Bestrahlung nimmt die Menge an phosphoryliertem p53 in den bestrahlten Zellen wieder ab. Dennoch ist in den bestrahlten noch achtmal mehr phosphoryliertes p53 vorhanden als in den unbehandelten Kontrollen. Auch nach 8h zeigen die „bystander“ Zellen keine Induktion des p53 nach Co-Kultivierung mit den bestrahlten Zellen.

Eine Untersuchung des Zellzyklus ergab, dass die Co-Kultur mit den bestrahlten T98G Zellen keinen Einfluß auf die Anzahl der Zellen in der G₂-Phase in den unbehandelten „bystander“ T98G Zellen hat.

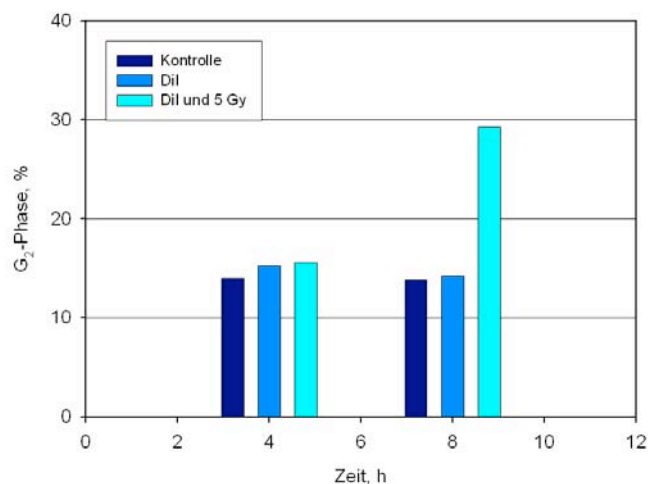


Abb. 63: Prozentualer Anteil der G₂-Phase in T98G Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden nach 4h und 8h fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

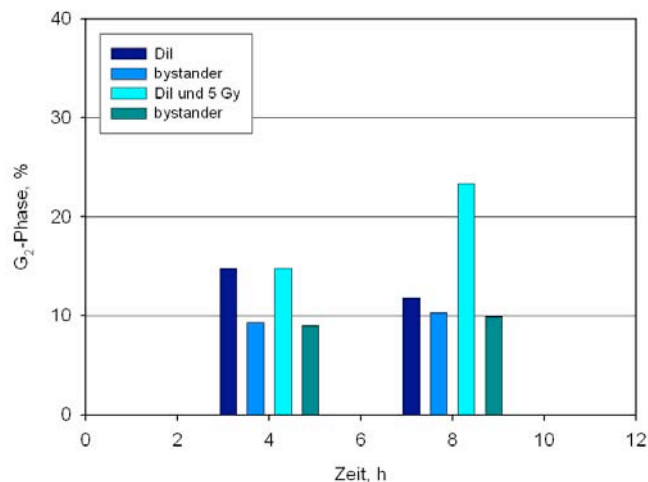


Abb. 64: Prozentualer Anteil der G₂-Phase gegen die Zeit nach Co-Kultivierung Die DiI gefärbten T98G Zellen (blauer Balken) wurden mit den unbehandelten „bystander“ T98G Zellen (hellblauer Balken) für die gezeigten Zeiträume co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Die DiI gefärbten und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten T98G Zellen, werden in der Abbildung durch einen cyanblauen Balken symbolisiert. Diese Zellpopulation wurden mit den unbehandelten „bystander“ T98G Zellen (grüner Balken) für die gezeigten Zeiträume co-kultiviert. Die Zellen wurden nach 4h und 8h mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

8h nach der Bestrahlung der T98G Zellen befindet sich eine deutlich erhöhte Anzahl der Zellen in der G₂-Phase (Abb. 63). Die Färbung der T98G Zellen mit DiI beeinflusst die G₂-Phase nicht. In Abbildung 64 ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G₂-Phase nach Co-Kultivierung mit den unbehandelten „bystander“ Zellen gezeigt. Die bestrahlten und DiI gefärbten T98G Zellen zeigen nach 8h einen G₂-Block (Abb. 64).

3.5.5 Die Ratten-Embryofibroblasten A1-5

Theoretischer Hintergrund für die Verwendung dieser Zelllinie:

Es konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie A1-5 verglichen mit normalen Ratten Embryofibroblasten extrem strahlenresistent ist (Hu et al. 2001). Diese Strahlenresistenz ist verbunden mit einer Verlängerung des G₂-Blockes. Bei Bestrahlung der A1-5 Zellen mit Dosen zwischen 2-6 Gy Röntgenstrahlen verlängert sich der G₂ Block um 8-48h (Cheong et al. 2001). Exponentiell wachsende A1-5 Zellen produzieren einen Faktor, der in den

A1-5 Zellen einen G₂-Block auslöst. Dieser „G₂-Arrest Modulating Activity“ (GAMA)-Faktor ist hitzeresistent und sensitive gegenüber einer Behandlung mit Trypsin. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem GAMA Faktor um ein Peptid handelt und dieser auch die „bystander“-Effekte in unbestrahlten Zellen auslösen könnte.

A1-5 Zellen sind Ratten Embryofibroblasten, transfiziert mit mouse val 135 p53 plus EJ-ras. Diese p53 Maus Mutante ist temperatursensitiv und zeigt eine Hemmung des Zellwachstums bei niedrigen Temperaturen (Martinez et al. 1991). Diese Zelllinie verfügt ebenfalls über gap junctions, denn die Kopplungseffizienz für den Klon 2 der A1-5 Zellen liegt bei 98% nach 4h Co-Kultur. In den folgenden Experimenten wurde analysiert, ob unbehandelte „bystander“-Zellen nach Co-Kultur mit bestrahlten Zellen einen „bystander“-Effekt zeigen. Als Endpunkte wurden die Induktion von phosphoryliertem p53 (vgl. 2.8.4) und die Verteilung im Zellzyklus (vgl. 2.14) untersucht.

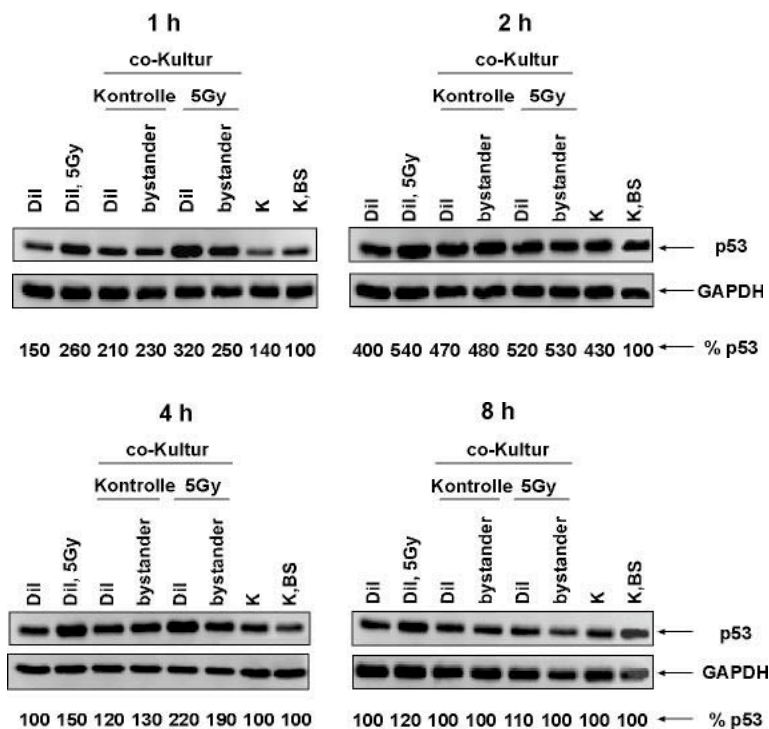


Abb. 65: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 im Klon 1 der Zelllinie A1-5.

Die DiI gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und für 1h, 2h, 4h und 8h mit dem unbehandelten Klon 2 der Zelllinie A1-5 co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Abkürzungen: K, BS: Kontrollzellen die nur im Brutschrank waren; K: Kontrolle.

Die bestrahlten Zellen wurden für 1h, 2h, 4h und 8h mit unbestrahlten Zellen co-kultiviert und anschließend durch Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™ (vgl. 2.12) wieder voneinander getrennt. In Abbildung 65 ist die Western Blot Analyse von p53 dargestellt. Da auch die unbehandelten A1-5 Zellen ohne Co-Kultivierung ein hohes p53 Signal aufweisen, wurde der Western Blot quantifiziert (Quantity One, Bio-Rad). So konnte überprüft werden, ob in den „bystander“ A1-5 Zellen mehr phosphoryliertes p53 vorliegt als in den unbehandelten Kontrollen. Die ermittelte relative Expression von p53 in % ist unter dem Western Blot für die einzelnen Proben graphisch dargestellt.

Die A1-5 Zellen, die nur im Brutschrank waren, zeigen keine Veränderung der p53 Expression während der Versuchsdauer. Nach 2h ist die Menge von p53 in allen Ansätzen gestiegen. Dies könnte auf den Stress (Färbung der Zellen, Trypsinieren etc.) zu Beginn des Experimentes zurückzuführen sein. Die DiI gefärbten und bestrahlten Zellen haben nach 2h am meisten phosphoryliertes p53. Danach nimmt das p53 Signal ab. Die DiI Färbung der Zellen hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Expression des p53. Die DiI gefärbten Zellen weisen die gleiche Menge an p53 auf wie die ungefärbten Kontrollen. Die „bystander“ Zellen die mit den unbestrahlten, aber DiI gefärbten Zellen co-kultiviert wurden, haben eine höhere p53 Expression als die Kontrollzellen, die nicht mit einer anderen Zellpopulation co-kultiviert wurden. Die erhöhte Menge an p53 könnte aber auch auf einen langsameren Abbau des p53 zurück zu führen sein. Dieser Unterschied zeigt sich besonders 1h nach Beginn der Kopplung. Auch die „bystander“ Zellen, die mit den bestrahlten und DiI gefärbten Zellen co-kultiviert wurden, zeigen ein höheres p53 Signal als die Kontrollzellen ohne Co-Kultur. Dennoch ist ein „bystander“-Effekt, der durch die Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen ausgelöst wurde, auszuschließen. In der Kontroll-Co-Kultur, in der die DiI gefärbten Zellen nicht bestrahlt wurden, zeigen die „bystander“ Zellen ebenfalls eine Zunahme der p53 Expression. Nach 8h ist das p53 Signal in allen Ansätzen auf das Niveau der Kontrollzellen, die nur im Brutschrank waren zurückgekehrt.

Da für diese Zelllinie ein verlängerter G₂-Block nach Bestrahlung gezeigt werden konnte, erfolgte als nächstes die Untersuchung des Zellzyklus. Dabei sollte überprüft werden, ob die Co-Kultur von bestrahlten mit unbestrahlten Zellen Einfluss hat auf den Anteil von G₂ Zellen in den unbestrahlten „bystander“ Zellen. Abbildung 66 fasst die Ergebnisse zusammen.

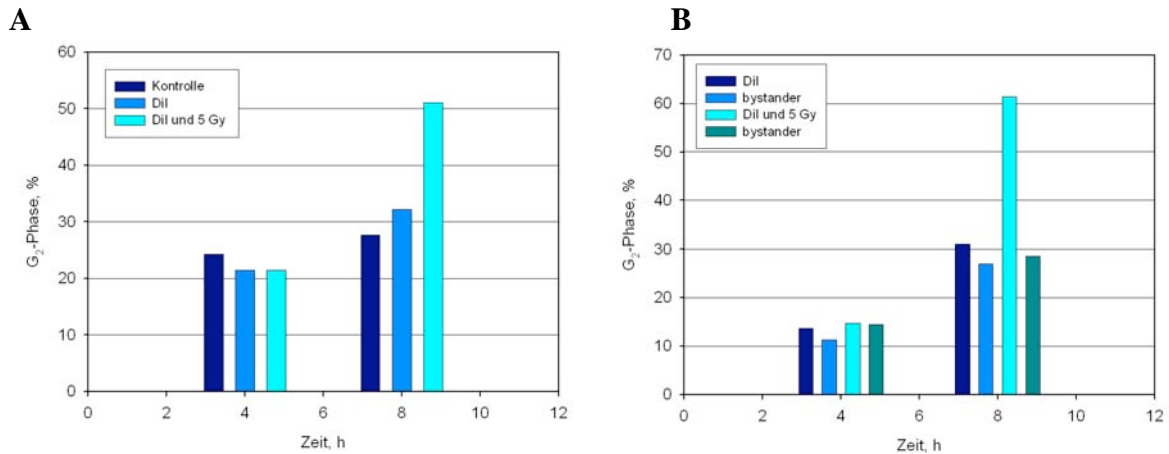


Abb. 66: A Prozentualer Anteil der G₂-Phase in A1-5 Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden nach 4h und 8h fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

B Prozentualer Anteil der G₂-Phase gegen die Zeit nach Co- Kultivierung Der DiI gefärbte Klon 2 der A1-5 Zellen (blauer Balken) wurden mit dem unbehandelten „bystander“ Klon 2 der A1-5 Zellen (hellblaue Balken) für die gezeigten Zeiträume co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Der DiI gefärbte und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Klon 2 der A1-5 Zellen, wird in der Abbildung durch einen cyanblauen Balken symbolisiert. Diese Zellpopulation wurden mit dem unbehandelten „bystander“ Klon 2 der A1-5 Zellen (grüner Balken) für die gezeigten Zeiträume co-kultiviert. Die Zellen wurden nach 4h und 8h mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

Eine deutlich erhöhte Anzahl der DiI gefärbten und bestrahlten Zellen ohne Co-Kultivierung mit anderen Zellen befindet sich 8h nach der Bestrahlung in der G₂-Phase. Auch die Färbung der Zellen mit DiI scheint den Anteil der G₂-Zellen zu erhöhen. Im Vergleich zum 4h Wert steigt der Anteil der Zellen in der G₂-Phase nach 8h an. Allerdings zeigen auch die unbehandelten Kontrollen eine Zunahme der Zellzahl in der G₂-Phase (Abb. 66 A). Nach 4h Co-Kultur von DiI gefärbten und bestrahlten A1-5 Zellen mit unbehandelten „bystander“ A1-5 Zellen, zeigen die „bystander“ Zellen den gleichen prozentualen Anteil der G₂-Phase wie die bestrahlten Zellen. 8h nach der Co-Kultur ist ebenso wie in den Zellpopulationen ohne Co- Kultivierung der Anteil der Zellen in der G₂-Phase gestiegen. Der Anteil der „bystander“ Zellen in der G₂-Phase nach Co-Kultur mit bestrahlten Zellen ist genauso hoch wie der G₂-Anteil der „bystander“ Zellen in dem unbestrahlten Co-Kultur Ansatz. Daher ist ein Effekt auf die G₂-Phase des Zellzyklus in

den „bystander“ Zellen durch die Co- Kultur mit bestrahlten Zellen auch für diese Zelllinie nicht gefunden worden.

3.5.6 Die menschliche Endothelzelllinie EA. hy 926

Diese Zelllinie ist wie die b-End Zellen eine Endothelzelllinie. Im Gegensatz zu den b-End handelt es sich bei diesen Zellen um eine humane Zelllinie. Genau wie die b-End Zellen verfügen die EA. hy 926 Zellen über gap junctions. Die Kopplungseffizienz liegt für die EA. hy 926 nach 4h Kopplungsdauer bei 91%. Für die EA. hy 926 Zellen konnte gezeigt werden, dass der Gehalt von Cx43 mRNA nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen transient herab reguliert wird (Banaz-Yasar et al. 2006). Dagegen zeigen die b-End Zellen bereits 15 min nach der Bestrahlung mit Röntgen eine signifikante Erhöhung der Cx43 mRNA-Menge. Ein Einfluss der Bestrahlung auf die Kopplungseffizienz konnte sowohl für b-End, als auch für die EA. hy 926 Zellen nicht nachgewiesen werden.

Da sich diese Zelllinien nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung im Bezug auf den Cx43 mRNA Gehalt unterscheiden, sollte im folgenden untersucht werden, ob sich die beiden Zelllinien auch bezüglich des „bystander“-Effektes unterscheiden. Dazu wurden unbehandelte „bystander“ EA. hy 926 Zellen mit bestrahlten EA. hy 926 Zellen für unterschiedliche Zeitspannen co-kultiviert. Nach Trennung der beiden Populationen mit dem Zellsorter (vgl. 2.12), wurden sowohl die bestrahlten als auch die „bystander“ Zellen untersucht. Dabei wurden als Endpunkte die Induktion von phosphoryliertem p53 (vgl. 2.8.4) und die Verteilung des Zellzyklus (vgl. 2.14) analysiert. In Abbildung 67 ist die Western Blot Analyse von p53 dargestellt.

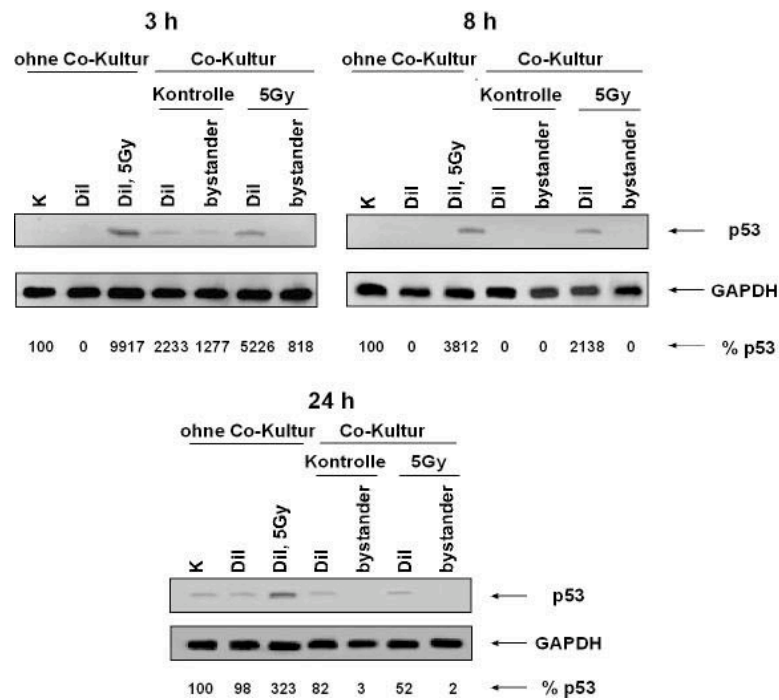


Abb. 67: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in EA. hy 926 Zellen. Die DiI gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und für 3h, 8h und 24h mit den unbehandelten EA. hy 926 Zellen co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Unter dem Western Blot ist die relative Expression von p53 angegeben (in %). Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Abkürzungen: K: Kontrolle.

Die direkt bestrahlten Zellen zeigen sowohl ohne als auch nach Co-Kultur eine erhöhte p53 Expression. In den bestrahlten Zellen, die mit den unbehandelten Zellen co-kultiviert wurden ist das p53 Signal etwas schwächer. 24h nach Beginn des Experimentes zeigen auch die Kontrollen und die DiI gefärbten Zellen, die nicht mit anderen Zellen co-kultiviert wurden, phosphoryliertes p53. In den „bystander“ EA. hy 926 Zellen, die mit den bestrahlten EA. hy 926 co-kultiviert wurden, ist zwar phosphoryliertes p53 detektierbar. Dennoch lässt sich ein Effekt der bestrahlten Zellen auf die unbestrahlten Zellen bezüglich der Phosphorylierung ausschließen. Da die „bystander“ Zellen, die mit den unbestrahlten Zellen co-kultiviert wurden ein fast doppelt so hohes p53 Signal zeigen.

Auch die Analyse des Zellzyklus ergab keine Hinweise auf einen „bystander“ Effekt in den nicht bestrahlten EA. hy 926 Zellen (Abb. 68 A). In den bestrahlten EA. hy 926 Zellen, die nicht mit anderen Zellen co-kultiviert wurden, erreicht der G₂-Block 8h nach der Bestrahlung sein Maximum (Abb. 68 B). 24h nach Bestrahlung ist der Anteil der G₂ – Phase wieder so hoch wie nach 3h. Nach 3h zeigen auch die unbestrahlten, DiI

gefärbten Zellen einen Anstieg in der G₂-Phase. Nach Co-Kultivierung der bestrahlten Zellen mit den unbestrahlten Zellen ist der Anteil der G₂-Phase in allen Zellpopulationen höher als in den Populationen ohne Co-Kultur. Die „bystander“ Zellen, die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, zeigen einen höheren G₂-Anteil als die „bystander“ Zellen, die mit unbestrahlten Zellen co-kultiviert wurden. Dennoch ist ein Effekt, der durch die Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen ausgelöst wurde, auszuschließen. Der Anteil der Zellen in der G₂-Phase in den DiI gefärbten Zellen verdoppelt sich nach Co-Kultur mit unbehandelten Zellen. Möglicherweise beeinflusst die Co-Kultivierung die Zellzyklusverteilung, oder das Sortieren der Zellen beeinflusst nach erfolgter Co-Kultur den Zellzyklus. In Abbildung 68 A und B ist die Verteilung der G₂-Phase im Verlauf der Zeit für die einzelnen Zellpopulationen zusammenfassend dargestellt.

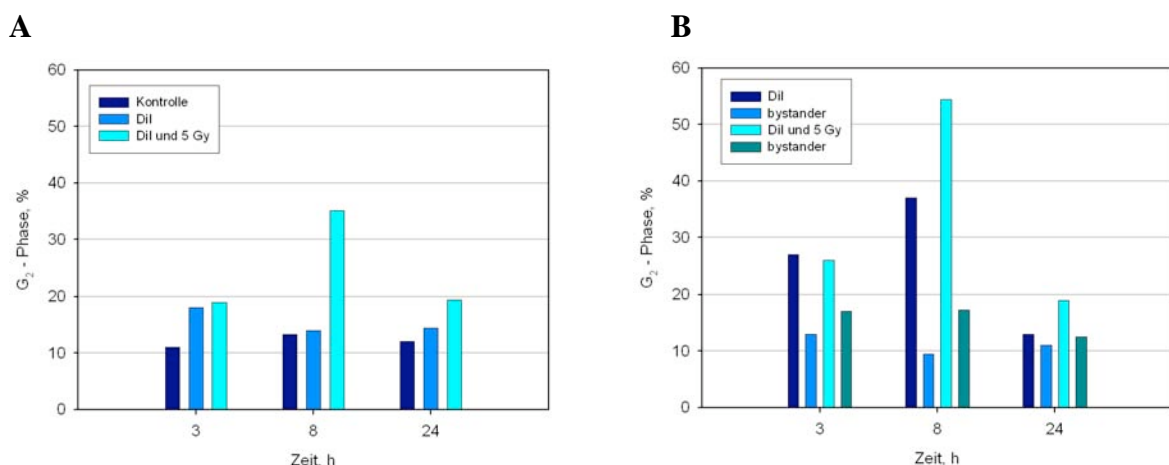


Abb. 68: A Prozentualer Anteil der G₂-Phase in EA. hy 926 Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden nach 3h, 8h und 24h fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

B Prozentualer Anteil der G₂-Phase gegen die Zeit nach Co-Kultivierung Die DiI gefärbten EA. hy 926 Zellen (blauer Balken) wurden mit dem unbehandelten „bystander“ EA. hy 926 Zellen (hellblauer Balken) für die gezeigten Zeiträume co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Die DiI gefärbten und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten EA. hy 926 Zellen, werden in der Abbildung durch einen cyanblauen Balken symbolisiert. Diese Zellpopulation wurde mit dem unbehandelten „bystander“ EA. hy 926 Zellen (grüner Balken) für die gezeigten Zeiträume co-kultiviert. Die Zellen wurden nach 3h, 8h und 24h mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

3.5.7 Die humane Lungencarcinoma Zelllinie A549

Da es sich bei den EA. hy 926 um eine Hybridzelllinie handelt, die durch Fusion von A549 Zellen und primären Endothelzellen entstanden ist, wurde im weiteren die Zelllinie A549 untersucht. Als erstes wurde überprüft, ob eine Co-Kultur von unbehandelten „bystander“ A549 mit bestrahlten A549 Zellen einen Einfluss auf die Phosphorylierung von p53 in den „bystander“ Zellen hat. In Abbildung 69 ist der Western Blot gezeigt.

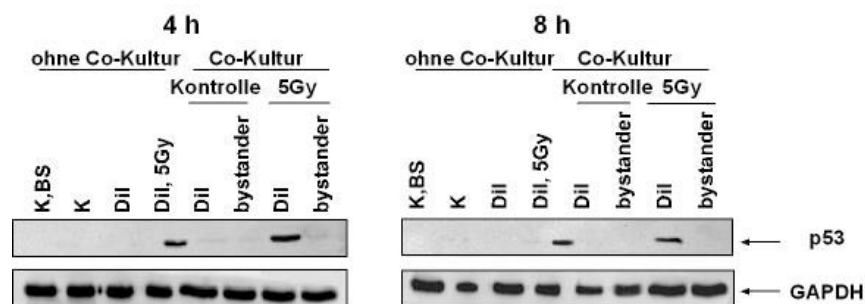


Abb. 69: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von p53 in A549 Zellen. Die Dil gefärbten Zellen wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und für 4h und 8h mit dem unbehandelten A549 Zellen co-kultiviert. Nach Trennung der Zellpopulationen mit Hilfe des Zellsorters wurden je 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Standardisierung wurde das Kontrollprotein GAPDH nachgewiesen. Abkürzungen: K, BS: Kontrollzellen, die nur im Brutschrank waren; K: Kontrolle

Nur in den direkt bestrahlten A549 Zellen konnte ein p53 Signal detektiert werden. 8h nach Bestrahlung nimmt das Signal bereits wieder ab. Eine Induktion der Phosphorylierung von p53 in den „bystander“ Zellen konnte nicht gezeigt werden.

Auch die Zellzyklusanalyse ergab keine Veränderung der G₂-Phase in den „bystander“ Zellen nach Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen (Abb. 70).

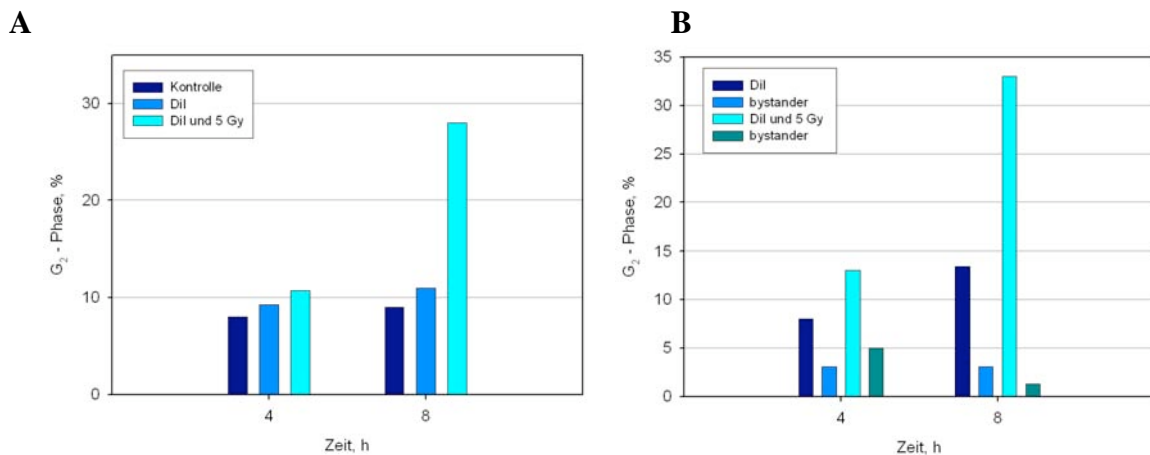


Abb. 70: A Prozentualer Anteil der G₂-Phase in A549 Zellen gegen die Zeit ohne Co-Kultivierung. Die Zellen wurden nach 4h und 8h fixiert und anschließend mit PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

B Prozentualer Anteil der G₂-Phase gegen die Zeit nach Co-Kultivierung Die DII gefärbten A549 Zellen (blauer Balken) wurden mit dem unbehandelten „bystander“ A549 Zellen (hellblauer Balken) für die gezeigten Zeitspannen co-kultiviert. Dieser Ansatz wurde nicht bestrahlt und diente als Kontrolle. Die DII gefärbten und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten A549 Zellen, werden in der Abbildung durch einen cyanblauen Balken symbolisiert. Diese Zellpopulation wurden mit dem unbehandelten „bystander“ A549 Zellen (grüner Balken) für die gezeigten Zeitspannen co-kultiviert. Die Zellen wurden nach 4h und 8h mit dem Zellsorter voneinander getrennt, fixiert und anschließend PI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Flow Cytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der G₂-Phase am Zellzyklus ist gegen die Zeit aufgetragen.

Die bestrahlten A549 Zellen zeigen 8h nach der Bestrahlung einen deutlichen G₂-Block (Abb. 70 A). Auch diese Zelllinie zeigt eine Erhöhung der Anzahl der Zellen in der G₂-Phase nach Co-Kultur. Der G₂-Block ist nach der Bestrahlung in den co-kultivierten Zellen höher, als in den bestrahlten Zellen ohne Co-Kultur (Abb. 70 B). Das legt die Vermutung nahe, dass die Co-Kultivierung mit einer anderen Zellpopulation oder der Sortiervorgang den Zellzyklus beeinflusst. Ein Einfluss der Co-Kultur zwischen den bestrahlten und unbestrahlten A549 auf die G₂-Phase konnte nicht gezeigt werden.

3.6 Untersuchung von „bystander“-Effekten mit Hilfe des „transwell insert coculture system“

Mit Hilfe der Co-Kultivierungsexperimente konnten in all den bisher untersuchten Zelllinien keine Hinweise auf einen „bystander“-Effekt bezüglich der untersuchten Endpunkte p53 und G₂-Block nachgewiesen werden. Daher wurde in dieser Arbeit ein weiteres System verwendet, um „bystander“-Effekte in nicht direkt bestrahlten Zellen zu untersuchen. Bei diesem System handelt es sich um das „transwell insert coculture system“ (Becton Dickinson) (vgl. 2.15). Dabei werden die bestrahlten Zellen von den unbestrahlten Zellen durch eine permeable Membran r getrennt.

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob unter Verwendung des „transwell insert coculture sytem“ ein „bystander“-Effekt in nicht direkt bestrahlten Zellen nachzuweisen ist. Während mit der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode die Beteiligung der gap junction vermittelten interzellulären Kommunikation an der Entwicklung von „bystander“ untersucht wurde, ist diese Verfahrenstechnik ein einfaches System zur Untersuchung von Medium-vermittelten „bystander“-Effekten.

Als Endpunkt wurde die Mikronukleusbildung in den „bystander“ Zellen untersucht. Dieser Endpunkt reflektiert den DNA-Schaden in den unbehandelten „bystander“ Zellen und wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben (vgl. 1.9).

3.6.1 Analyse von Mikronuklei in binukleären b-End Zellen ohne Co- Kultur

Zunächst wurden die Häufigkeiten der spontanen Mikronuklei in unbestrahlten b-End Zellen und die Abhängigkeit der Mikronukleus-Expression von der Strahlendosis in bestrahlten b-End Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der Mikronukleus-Expression nach Bestrahlung wurden die b-End Zellen mit 1 Gy und 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt. Abbildung 71 zeigt exemplarisch zwei homogen mit Acridinorange gefärbte Präparate (vgl. 2.16.4).

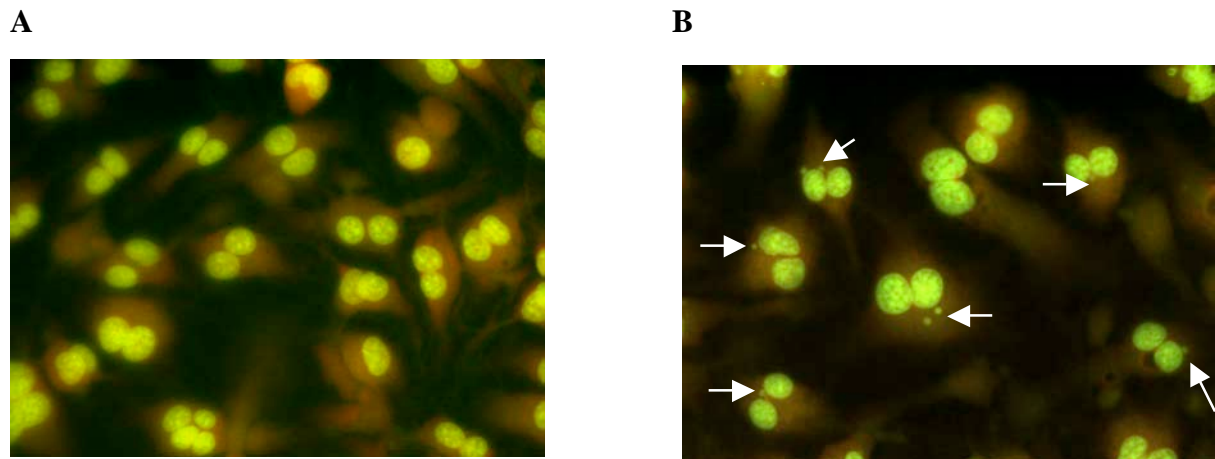


Abb. 71: Acridinorange gefärbte zweikernige b-End Zellen. Die DNA erscheint bei dieser Färbung grün und die RNA orange-rot. **A** unbehandelte b-End Zellen; **B** mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte b- End Zellen. Die binukleären b-End Zellen mit 1 bzw. 2 Mikronuklei sind mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet.

Der Effekt von Röntgenstrahlung auf die Induktion von Mikronuklei (MN) ist in Abbildung 72 dargestellt. Die Abbildung zeigt die mittleren MN-Häufigkeiten in zweikernigen b-End Zellen (MN/1000 BNC) aus je vier unabhängigen Versuchen ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 1 Gy und 5 Gy. Für die b-End Zellen ist ein dosisabhängiger Anstieg der MN Häufigkeit zu verzeichnen (Abb. 72). Die spontanen MN Frequenzen in den unbestrahlten b-End Zellen lagen zwischen 51 und 130 MN in 1000 zweikernigen Zellen. Nach Bestrahlung mit 1 Gy stiegen die MN-Häufigkeiten auf 141 bis 494 MN/1000 BNC an, nach Bestrahlung mit 5 Gy auf bis zu 2000 MN/1000 BNC. Die Kontrollen zeigen eine auffällig hohe spontane Häufigkeit von Mikronuklei. Im Vergleich dazu liegt die spontane MN Frequenz in unbehandelten Lymphozyten zwischen 10-30 MN/1000 BNC (Müller und Streffer 1994).

In einem Experiment zeigten die Kontrollen eine spontane MN Frequenz von 15 MN/1000 BNC. Nach Bestrahlung mit 1 Gy stieg die MK Häufigkeit auf 114 MN/1000 BNC und nach Bestrahlung mit 5 Gy auf 471 MN/1000 BNC. Da dieses Ergebnis nicht reproduzierbar war, wurde es bei der Auswertung als „Ausreißer“ angesehen und nicht berücksichtigt.

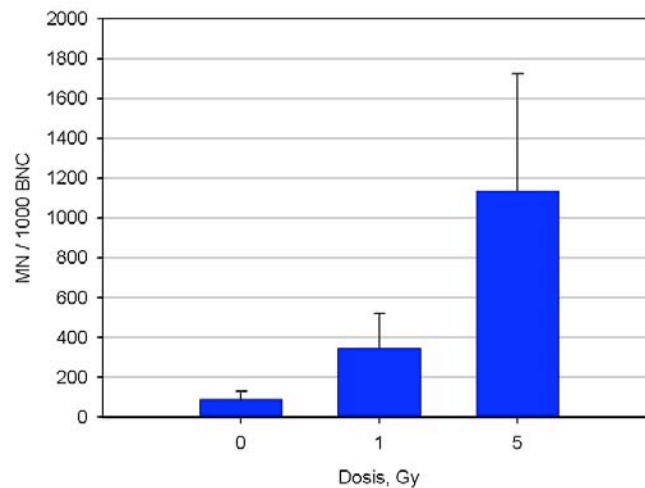


Abb. 72: Effekt von Röntgenstrahlung auf die MN Induktion in b-End Zellen. Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen +/- SD.

3.6.2 Analyse von Mikronuklei in unbehandelten b-End Zellen nach Co-Kultur mit bestrahlten b-End Zellen

Um zu untersuchen, ob bestrahlte b-End Zellen Signale aussenden, die zu einem DNA-Schaden in unbehandelten „bystander“ b-End Zellen führen, wurde die MN-Häufigkeit in direkt bestrahlten b-End Zellen und „bystander“ b-End Zellen untersucht. Dazu wurden bestrahlte und unbestrahlte b-End Zellen unter Verwendung des „transwell insert coculture system“ für 1h und 8h co-kultiviert (vgl. 2.15). Die b-End Zellen auf den Multiwell Platten wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Trennung der beiden Populationen erfolgte indem die Membraneinsätze mit den „bystander“ b-End Zellen nach erfolgter Co-Kultur wieder aus den Multiwell Platten entfernt wurden. Abbildung 73 A zeigt die MN-Häufigkeiten in b-End Zellen ohne die Co-Kultivierung mit anderen b-End Zellen. Die MN-Häufigkeit in den „bystander“ Zellen nach erfolgter Co-Kultur mit bestrahlten Zellen ist in Abbildung 73 B dargestellt. Als Kontrolle diente jeweils ein Co-Kulturansatz indem „bystander“ b-End Zellen mit unbestrahlten b-End Zellen co-kultiviert wurden.

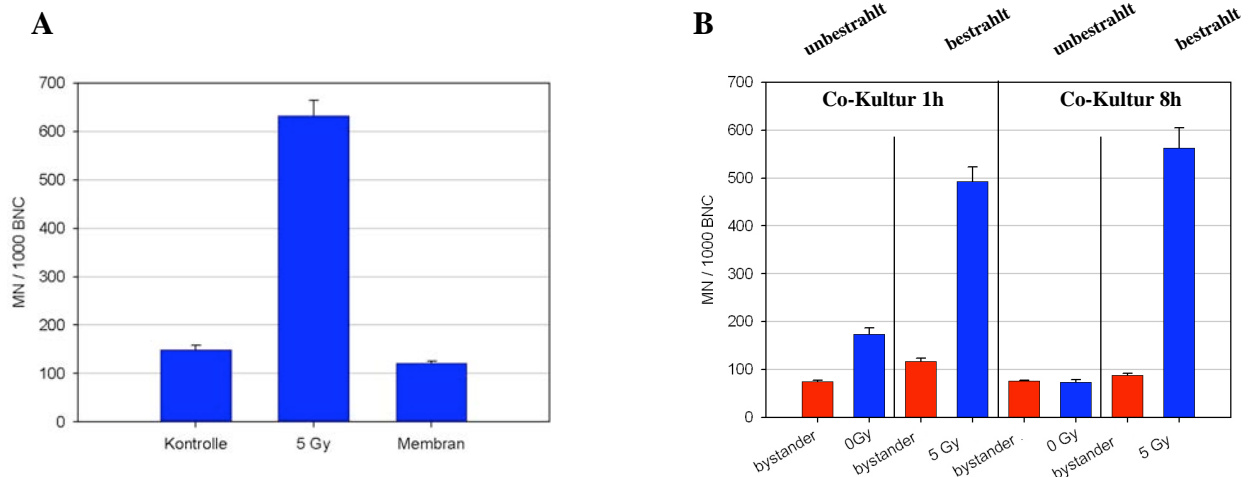


Abb. 73: Effekt von Röntgenstrahlung auf die MN Induktion in unbehandelten b-End Zellen nach Co-Kultur mit behandelten Zellen. A MN Häufigkeit in b-End Zellen ohne Co-Kultivierung mit anderen b-End Zellen. Die b-End Zellen auf der Membran wurden nicht bestrahlt. Diese Ansätze dienen als Kontrolle zu den bestrahlten Co-Kulturen. **B MN Häufigkeit in b-End Zellen nach Co-Kultivierung mit bestrahlten b-End Zellen.** Die „bystander“ Zellen sind im Diagramm rot dargestellt. Die b-End Zellen auf der Multiwell Platte wurden mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt. Die bestrahlten bzw. unbestrahlten b-End Zellen, die mit den „bystander“ b-End Zellen co-kultiviert wurden, sind im Diagramm blau dargestellt. Die Co-Kultivierung der „bystander“ Zellen mit den bestrahlten bzw. unbestrahlten Zellen erfolgte für 1h und 8h. Der Ansatz, in dem die unbestrahlten b-End Zellen mit den „bystander“ b-End Zellen co-kultiviert wurden, diente als Kontrolle zu dem bestrahlten Ansatz. Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen +/- SD.

Die Abbildung 73 zeigt die mittleren MN-Häufigkeiten in zweikernigen „bystander“ b-End Zellen (MN/1000 BNC) aus je drei unabhängigen Versuchen ohne Co-Kultur und nach Co-Kultur mit bestrahlten bzw. unbestrahlten b-End Zellen. Die spontanen MN Frequenzen lagen nach 1h Co-Kultur in den unbestrahlten b-End Zellen zwischen 161 und 174 MN in 1000 zweikernigen Zellen. Nach 8h Co-Kultur nahm die spontane MN Frequenz in den unbestrahlten b-End Zellen ab auf 69 bis 79 MN in 1000 zweikernigen b-End Zellen. 1h nach Bestrahlung mit 5 Gy stiegen die MN Häufigkeiten auf 463 bis 493 MN/1000 BNC an, 8h nach Bestrahlung mit 5 Gy auf bis zu 604 MN/1000 BNC. Die MN Frequenzen in den „bystander“ Zellen die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, lag zwischen 111 und 123 MN/1000 BNC (nach 1h Co-Kultur) und 84 und 91 MN/1000BNC (nach 8h Co-Kultur). In den Kontroll Zellen ohne Co-Kultur lag die MN Häufigkeit zwischen 140 und 158 MN/1000 BNC (Abb. 73 A). Da die MN Frequenz in den „bystander“ Zellen der MN-Häufigkeit in den Kontrollen ohne Co-Kultur entspricht ist auch hier ein „bystander“-Effekt bezüglich der MN Induktion in nicht direkt bestrahlten Zellen durch die Co-Kultur mit bestrahlten Zellen auszuschließen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der interzellulären Kommunikation über gap junctions bei der Entwicklung von „bystander“-Effekten zu untersuchen. Dazu wurde zunächst ein System entwickelt, das es ermöglicht, die gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation (GJIC) zu messen. Dieses System beruht auf dem *Parachute Assay* (Ziambaras, Lecanda et al. 1998; Czyz, Irmer et al. 2000), der für diese Arbeit modifiziert wurde. Bei dieser Technik werden die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenz-Farbstoffe Calcein AM und DiI gefärbt und anschließend wird der Kopplungsgrad mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie ermittelt. Um dieses System zu etablieren, wurden die Zelllinien b-End und Jeg3 verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie b-End exprimiert die Connexine Cx 37, Cx 40 und Cx 43 und ist somit in der Lage, über gap junctions zu kommunizieren (Montesano *et al.*, 1990). Dagegen ist die für die Kopplungsanalysen verwendete Jeg3 Zelllinie kommunikationsdefizient (Hellmann, Winterhager et al. 1996). Des weiteren wurden im Rahmen dieser Studie Co-Kultivierungsexperimente entwickelt, die es erlauben, „bystander“-Effekte zu untersuchen, ohne Bestrahlung einzelner Zellen mit einem Microbeam und ohne Mediumtransfer. In diesem experimentellen Ansatz wurden die bestrahlten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI gefärbt und für verschiedene Zeitspannen mit unbestrahlten und ungefärbten „bystander“-Zellen co-kultiviert. Während der Co-Kultivierung stehen die bestrahlten Zellen in direktem Kontakt zu den unbestrahlten Zellen. Durch anschließende Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™ wurde eine getrennte Untersuchung der Zellreaktion sowohl der bestrahlten Zellpopulation als auch der unbestrahlten Zellpopulation ermöglicht.

Darüber hinaus wird postuliert, dass es einen zweiten Mechanismus gibt, durch den Signalproteine von bestrahlten auf unbestrahlte Zellen übertragen werden (Little 2006). Bei diesem Mechanismus werden die „bystander“-Effekte durch lösliche Faktoren hervorgerufen, die von den bestrahlten Zellen ins Medium abgegeben werden. Um diese Medium-vermittelten „bystander“-Effekte zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das „transwell insert coculture system“ verwendet. Dabei werden die bestrahlten Zellen von den unbestrahlten Zellen durch eine permeable Membran voneinander getrennt.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methoden sind die Voraussetzungen geschaffen worden, um „bystander“-Effekte in nicht direkt bestrahlten Zellen zu untersuchen. Zum einen können „bystander“-Effekte untersucht werden, die durch die Übertragung von Signalen von bestrahlten Zellen in unbestrahlte Zellen über gap junctions ausgelöst werden. Zum anderen ist es möglich „bystander“-Effekte zu untersuchen, die ausgelöst werden, indem bestrahlte Zellen lösliche Faktoren ins Medium abgeben.

Die erzielten Ergebnisse und die verwendeten Methoden werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.1 Untersuchung der Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM und DiI

Die Farbstoffe Calcein AM und DiI wurden in dieser Arbeit verwendet, um den Grad der interzellulären Kommunikation zu ermitteln. Ferner wurde der Farbstoff DiI eingesetzt, um die bestrahlten Zellen von den unbestrahlten „bystander“ Zellen nach entsprechender Co-Kultivierungszeit durch fluoreszenz-aktiviertes Zellsorting wieder voneinander zu trennen. Dieser experimentelle Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und kam hier erstmalig zum Einsatz. Daher war es notwendig, die für diese experimentellen Anforderungen geeigneten Farbstoffe zu wählen. Da es bislang keine Untersuchungen bezüglich der Toxizität der Farbstoffe, der Färbekinetik oder dem Einfluss von Bestrahlung auf die Färbung gab, wurden zunächst die Eigenschaften der Farbstoffe untersucht.

Für die Zelllinien b-End und Jeg3 konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Farbstoffes DiI keinen Einfluss auf die Zellproliferation hat. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zellen gleichmäßig mit DiI gefärbt werden und die Färbung über einen Zeitraum von 6 Tagen stabil ist. Damit wurden die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt (Malhotra *et al.* 1998).

Ein weiterer wichtiger Parameter war der Farbübertrag von DiI gefärbten Zellen auf ungefärbte Zellen. Wenn die ungefärbten Zellen trypsiniert werden und auf die DiI gefärbten Zellen gegeben werden, ist der Farbübertrag größer als bei Trypsinierung der DiI gefärbten Zellen. Aufgrund des Farbübertrages wurden als Alternative zu dem Farbstoff DiI verschiedene DiI-Derivate getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Färbung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen zellspezifisch ist. Darüber hinaus wurde der Farbstoff Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA SE) verwendet, um die Zellen zu

färben. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser Farbstoff für die geplanten Experimente nicht geeignet ist, da er bereits 2h nach der Färbung zur Hälfte von den Zellen metabolisiert wurde. Letztendlich war der Farbstoff DiI, obwohl ein geringer Farbübertrag unvermeidbar war, am besten geeignet für die folgenden Co-Kultivierungsexperimente.

Durch Zellzyklusanalysen konnte gezeigt werden, dass die Färbung der Zellen mit DiI keinen Einfluss auf den Zellzyklus hat. Auch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und die Bestrahlung mit Neutronen in Kombination mit der DiI Färbung hatte keine negativen Auswirkungen auf den Zellzyklus.

Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen mit dem Farbstoff Calcein AM. Auch hier wurde keine toxische Wirkung auf die Zellen beobachtet. Die Zellen konnten gleichmäßig mit Calcein gefärbt werden. Allerdings ist die Färbung nicht sehr stabil, da der Farbstoff nach 24h fast vollständig innerhalb der Zellen metabolisiert wird.

4.2 Nachweis der interzellulären Kommunikation über gap junctions mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein AM und DiI

Um sicherstellen zu können, dass eine Kommunikation über gap junctions zwischen den Zellen stattfindet, wurde der Kopplungsgrad der Zelllinien bestimmt. Dazu wurde der *Parachute Assay* in modifizierter Form in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie angewendet (Tomasetto, Neveu et al. 1993; Czyz, Irmer et al. 2000). Nach Färbung der Akzeptorzellen mit DiI wurden diese für 4h mit den Calcein AM gefärbten Donorzellen co-kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen im FACS-Gerät. Der Grad der Kopplung konnte durch die Berechnung der Anzahl an kommunizierenden Akzeptorzellen (DiI gefärbte Zellen, die Calcein aufgenommen haben) quantifiziert werden. Durch Optimierung der einzelnen Kopplungsparameter wie z.B. Kopplungszeit, Zellzahl, Verhältnis von Donor- zu Akzeptorzellen, konnte im Rahmen dieser Arbeit der Farbstoff-Transfer-Assay effizient und verlässlich etabliert werden. Dieser Farbstoff-Transfer-Assay wurde in abgewandelter Form bereits verwendet, um die regelbare Kopplung über gap junctions mit dem induzierbaren Tet-System mittels der FACS-Analyse zu quantifizieren (Gellhaus 2003). Im Vergleich dazu weist die Mikroinjektion von gap junction permeablen

Farbstoffen wie z.B: Lucifer yellow zur Ermittlung der Kopplungseffizienz mehrere Nachteile auf (Elfgang, Eckert et al. 1995). Zum einen wird die Zelle durch die Mikroinjektion des Farbstoffes verletzt. Zum anderen ist das Auszählen der Zellen sehr subjektiv. Dazu kommt, dass die Permeabilität des verwendeten Farbstoffes von der jeweiligen Isoform der Connexine abhängt. Ein weiterer Nachteil der Mikroinjektion ist, dass die Anzahl an Zellen, die pro Experiment ausgewertet werden kann, sehr gering ist.

Der Hauptvorteil des hier angewendeten Kopplungs-Assays liegt darin, dass es mit dieser Methode möglich ist, den Kopplungsgrad in einer ganzen Zellpopulation zu ermitteln und nicht lediglich in einzelnen gekoppelten Zellpaaren, wie dies über die Mikroinjektion von Farbstoffen der Fall ist.

4.3 Untersuchung von „bystander“-Effekten in nicht bestrahlten Zellen mit Hilfe der Co-Kulturtechnik

Für viele Jahre galt als zentrales Paradigma in der Radiobiologie, dass biologische Effekte, die durch Bestrahlung ausgelöst werden, nur in direkt bestrahlten Zellen zu finden sind (Little 2006). Zu diesen Effekten gehören reduziertes Zellwachstum, Zelltod, Chromosomen-Aberrationen, Mutationen, genomische Instabilität, sowie eine Erhöhung der intrazellulären ROS (reactive oxygen species) (Mothersill and Seymour 2004). In letzter Zeit häuften sich jedoch die Hinweise, dass bestrahlte Zellen Signale an nicht bestrahlte Zellen in der Population übertragen, die dazu führen, dass die unbestrahlten „bystander“ Zellen ebenfalls Strahleneffekte zeigen. Dieses Phänomen wird als „strahleninduzierter – bystander Effekt“ bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Co-Kultivierungssystem entwickelt und etabliert, das es ermöglicht „bystander“ Effekte in unbestrahlten Zellen zu untersuchen. Dabei werden die bestrahlten Zellen und die unbestrahlten „bystander“ Zellen nach erfolgter Co-Kultur durch Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™ wieder voneinander getrennt. Im Anschluß ist eine separate Untersuchung sowohl der bestrahlten Zellen als auch der unbestrahlten „bystander“ Zellen möglich.

4.3.1 Co-Kultivierung von bestrahlten und unbestrahlten Zellen und anschließende Zellsortierung mit dem EPICS® Altra™

Bislang war ein wichtiges System zur Untersuchung von „bystander“-Effekten, die Bestrahlung einzelner Zellen mit einem Microbeam (Folkard M 1997; Folkard M.,

Vojnovic B. et al. 1997; Folkard, Schettino et al. 2001). Mit Hilfe der Microbeam Technik ist es möglich, ausgewählte Zellen oder zelluläre Komponenten innerhalb einer Zellpopulation mit einer exakten Anzahl von Partikeln zu bestrahlen. In den meisten Studien erfolgt die Bestrahlung der Zellpopulationen mit α -Teilchen (Hei, Wu et al. 1997; Prise, Belyakov et al. 1998). Nagasawa und Little (1992) konnten eine Erhöhung der Schwesterchromatid Austausche (SCEs) in 30% der analysierten Zellen zeigen, obwohl nur 0,1%-1% der Zellkerne von einem α -Teilchen durchquert wurden. Diese Beobachtungen wurden später von Lehnert *et al.* bestätigt und erweitert (Deshpande, Goodwin et al. 1996; Lehnert and Goodwin EH. 1997). Die Erhöhung der SCEs konnte durch Superoxid Dismutase inhibiert werden, was wiederum für eine Beteiligung von „reactive oxygen species“ (ROS) spricht (Narayanan, Goodwin et al. 1997; Narayanan, LaRue et al. 1999). Darüber hinaus kommt es nach Bestrahlung mit geringen Dosen von α -Partikeln zu einer Erhöhung der Mutationsrate (Nagasawa and Little 1999) und zur Erhöhung des Tumorsuppressor Proteins p53 (Hickman, Jaramillo et al. 1994). Ob die Induktion der Mutationen oder die Erhöhung der Genexpression durch ROS vermittelt wird ist unklar. Fest steht jedoch, dass die gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation an der Übertragung der Signale von den bestrahlten auf die unbestrahlten Zellen beteiligt ist. Ferner konnte eine Beteiligung von Connexin 43 an der Entwicklung von „bystander“-Effekten nachgewiesen werden (Azzam, de Toledo et al. 1998; Azzam, de Toledo et al. 2001).

Des Weiteren wurde die Bestrahlung mit dem Microbeam eingesetzt, um speziell den Effekt der Bestrahlung des Cytoplasmas sowohl in bestrahlten Zellen als auch in unbestrahlten „bystander“ Zellen zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach der Bestrahlung des Cytoplasmas mit $^3\text{He}^{2+}$ zu einer Erhöhung der Mikronucleus-Frequenz in der benachbarten „bystander“ Zellen kommt (Shao, Folkard et al. 2004). Wu *et al.* konnten zeigen, dass es nach Bestrahlung des Cytoplasmas mit α -Partikeln zu einer Erhöhung der Mutationsrate kommt (Wu, Randers-Pehrson et al. 1999).

Ein großer Vorteil der Bestrahlung mit dem Microbeam ist, dass die meisten Zellen innerhalb der Population nicht von einem α -Partikel getroffen werden und die Bestrahlung der Zellen somit relativ schonend ist. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Zellen als Monolayer auf Trägermaterial wachsen müssen. Unter diesen Kulturbedingungen haben die Zellen das Bedürfnis abgeflachter und gestreckter zu wachsen, als sie es normalerweise in einer dreidimensionalen *in vivo* Situation tun.

Das in dieser Arbeit entwickelte Co-Kultivierungssystem basiert auf der Co-Kultur einer bestrahlten Zellpopulation mit einer unbestrahlten Zellpopulation. Durch die anschließende Zellsortierung können die beiden Populationen wieder getrennt und separat voneinander untersucht werden. In diesem experimentellen Ansatz sind die unbestrahlten „bystander“ Zellen wirklich 100% unbestrahlt. Denn die „bystander“ Zellen und die bestrahlten Zellen werden erst nach erfolgter Bestrahlung zusammen kultiviert. Darüber hinaus bietet dieses System gegenüber der Microbeam Technik den Vorteil, dass die Reaktion der unbehandelten „bystander“ Zellen sowohl nach Bestrahlung unter niedrig als auch nach Bestrahlung unter hoch LET Bedingungen untersucht werden kann. Denn bislang gibt es keine detaillierten Untersuchungen von „bystander“-Effekten nach Bestrahlung mit niedrig LET und anschließender Kultivierung der bestrahlten und unbestrahlten Zellen in derselben physikalischen Umgebung. Im Gegensatz zur Bestrahlung mit geladenen Partikeln gibt es bei der Bestrahlung mit niedrig LET sowohl praktische als auch technische Probleme. Da Photonen auf vielfältige Weise mit Materie interagieren (klassische Streuung sowie Photo-, Compton- und Paarbildung) ist eine Bestrahlung von einzelnen Zellen oder einzelnen zellulären Komponenten wie mit geladenen Partikeln nicht möglich.

Ein weiteres System, das bislang zur Untersuchung von „bystander“-Effekten eingesetzt wurde, sind die Mediumtransfer-Experimente. Mothersill und Seymour konnten zeigen, dass es zur einer Reduktion der „Plating Efficiency“ in unbestrahlten Zellen kommt, nachdem die Zellen das Medium von bestrahlten Zellen erhalten haben (Mothersill und Seymour 1997). Diese Beobachtungen legten nahe, dass bestrahlte Zellen eine toxische Substanz freisetzen. Dieser sogenannte „bystander“-Faktor kann dazu führen, dass unbestrahlte Zellen abgetötet werden. Medium, das ohne die Anwesenheit von Zellen bestrahlt wurde, hat dagegen keinen Effekt auf unbestrahlte Zellen (Mothersill und Seymour 1997). Der erste nachweisbare Effekt in „bystander“ Zellen, die das Medium mit dem „bystander“-Faktor von bestrahlten Zellen erhalten haben, war eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration begleitet von einer Änderung der mitochondrialen Membranpermeabilität und einer Induktion von ROS (Lyng, Seymour et al. 2000; Mothersill, Stamato et al. 2000). Ein direkter Zell-Zell-Kontakt während der Bestrahlung ist nicht notwendig, um in den „bystander“ Zellen den induzierten Zelltod auszulösen, aber Medium von Zellkulturen, die mit hohen Dosen bestrahlt wurden, führt zu einer Zunahme des induzierten Zelltodes in den „bystander“ Zellen (Mothersill und Seymour 1998). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Apoptose Inhibitoren

oder Medium von Lactatdehydrogenase oder Glucose-6-Phosphatdehydrogenase defizienten Zellen den „bystander“-Effekt reduziert oder sogar verhindert (Mothersill, Stamato et al. 2000). Menschliche „Reparatur-defiziente“ Zelllinien zeigen sowohl leichte als auch schwerwiegende „bystander“-Effekte bezüglich des induzierten Zelltodes. Dagegen zeigen normale „reparaturfähige“ Zelllinien weitaus weniger schwerwiegende oder gar fehlende „bystander“ induzierte Effekte auf die „Cloning Efficiency“. Diese Daten stützen die Hypothese, dass „bystander“-Effekte eine schützende Funktion in biologischen Systemen ausüben, indem sie die Zellteilung der Zellen stoppen, die einen DNA-Schaden haben. Deshalb antworten „Reparatur-defiziente“ Zellen, unabhängig von ihrem Reparaturdefekt, auf einen DNA-Schaden innerhalb der Population, indem sie die Anzahl der geschädigten Zellen durch induzierten Zelltod verringern (Mothersill, Seymour et al. 2004). Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Beobachtungen von Nagasawa und Little überein. Sie konnten zeigen, dass sowohl Wildtyp als auch „Reparatur-defiziente“ (xrs-5) CHO Zellen nach Bestrahlung mit geringen Dichten von α -Partikeln als „bystander“-Effekt eine Erhöhung der chromosomalen Aberrationen aufweisen. Auch für diese Zelllinie ist der „bystander“-Effekt in den „Reparatur-defizienten“ Zelllinien stärker als in der Wildtyp Zelllinie. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Wildtyp-Zellen in der Lage sind Doppelstrangbrüche zu reparieren, während die „Reparatur-defizienten“ xrs-5 Zellen dazu nicht in der Lage sind. Das führt dann zu einer dramatischen Erhöhung der chromosomalen Aberrationen in den xrs-5 Zellen (Nagasawa und Little 2002).

Dagegen beschreiben Iyer und Lehnert nach Inkubation von menschlichen Fibroblasten in bestrahltem Medium eine völlig andere zelluläre Antwort der „bystander“ Zellen. Sie konnten eine Abnahme von p53 und CDKN1A/Q in unbestrahlten Zellen zeigen, die begleitet war von einer Zunahme der Proteine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und CDC2 (Iyer und Lehnert 2000). Im Gegensatz dazu beschreiben andere Gruppen eine Zunahme von p53 (Hickman, Jaramillo et al. 1994; Azzam, de Toledo et al. 2001). Im Gegensatz zu den beschriebenen Microbeam-Experimenten werden die Zellen im Großteil der oben beschriebenen Mediumtransfer-Experimente mit niedrig LET bestrahlt, um einen „bystander“ – Effekt in unbestrahlten Zellen auszulösen (Mothersill und Seymour 2001; Mothersill und Seymour 2003).

In den oben beschriebenen Mediumtransfer-Experimenten ist es aufgrund der Versuchsbedingungen nicht möglich, die Beteiligung der interzellulären Kommunikation über gap junctions an der Entwicklung von „bystander“-Effekten zu untersuchen. Denn in diesen Experimenten bleiben die bestrahlten und die unbestrahlten „bystander“ Zellen

räumlich voneinander getrennt. Sie teilen sich nur das Medium, indem das Medium nach der Bestrahlung der Zellen auf die „bystander“-Zellen übertragen wird. Die Beteiligung von gap junctions an den „bystander“-Effekten ist für die Mediumtransfer-Experimente auch nicht weiter von Bedeutung, denn aus den Experimenten geht klar hervor, dass der Faktor, der die „bystander“-Antwort auslöst, in einer aktiven Form von den Zellen ausgeschieden werden kann und dass interzelluläre Kommunikation über gap junctions für die Entwicklung des Faktors bzw. die Entwicklung von „bystander“-Effekten nicht nötig ist (Mothersill und Seymour 1997; Mothersill und Seymour 1998; Lyng, Seymour et al. 2000; Mothersill, Stamato et al. 2000; Seymour und Mothersill 2000; Mothersill, Rea et al. 2001; Yang, Asaad et al. 2005).

Dennoch scheint es vor allem bei der Microbeam-Bestrahlung so zu sein, dass die interzelluläre Kommunikation über gap junctions benötigt wird für die Entwicklung von „bystander“-Effekten (Mothersill und Seymour 1997; Azzam, de Toledo et al. 1998; Bishayee, Rao et al. 1999; Zhou, Randers-Pehrson et al. 2000; Azzam, de Toledo et al. 2001; Zhou, Suzuki et al. 2001). In diesem Zusammenhang belegen verschiedene Studien, dass die „bystander“-Effekte nahezu vollständig aufgehoben werden, wenn die gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation verhindert wird (Mothersill und Seymour 1997; Azzam, de Toledo et al. 1998; Bishayee, Rao et al. 1999; Zhou, Randers-Pehrson et al. 2000; Azzam, de Toledo et al. 2001; Zhou, Suzuki et al. 2001). Allerdings hat der Einsatz von gap junction Inhibitoren wie z.B. Lindan oder Octanol auch Nachteile. Der gap junction Inhibitor Lindan hat sekundäre Einflüsse auf das intrazelluläre Ca^{2+} Potential und auf das mitochondriale Membranpotential. Während Octanol zusätzliche sekundäre Effekte auf die Membranen ausübt. Das beeinflusst die Ergebnisse und erschwert die Interpretation bezüglich der Notwendigkeit von gap junction vermittelter interzellulärer Kommunikation (Iyer und Lehnert 2000).

Mit Hilfe des in dieser Arbeit erstmals verwendeten Co- Kultivierungssystems kann die Entwicklung von „bystander“-Effekten in unbestrahlten Zellen nach erfolgter Co-Kultur mit bestrahlten Zellen untersucht werden. Darüber hinaus ist es möglich ohne zusätzlichen experimentellen Aufwand oder den Einsatz von Inhibitoren, Informationen über die Beteiligung der gap junction vermittelten interzellulären Kommunikation zu erhalten.

Neben all den bisher beschriebenen Vorteilen des Co-Kultivierungssystems besitzt das System auch einen wesentlichen Nachteil gegenüber den bislang in der Literatur beschriebenen Methoden zur Untersuchung von „bystander“-Effekten. Denn um die

bestrahlten Zellen mit den unbestrahlten „bystander“ Zellen co-kultivieren zu können, muss die bestrahlte und DiI gefärbte Zellpopulation abgelöst und auf die „bystander“ Zellen gegeben werden. Zum Ablösen der adhärennten Zellen von der Petrischale wurde die Protease Trypsin verwendet. Bei dieser handelt es sich um eine Endopeptidase, welche Peptidbindungen neben den Aminosäureresten Lysin und Arginin spalten kann. Durch die Anwendung von Trypsin kommt es zu einer Störung der Kulturgefäßoberflächen-Zellmembran-Wechselwirkungen, wodurch sich die Zellen schließlich ablösen lassen. Daher benötigen die Zellen nach dem Trypsinieren einige Zeit, um sich zu regenerieren. Erschwerend kommt hinzu, dass es immer eine gewisse Zeit dauert, bis bestrahlte und unbestrahlte Zellen in Kontakt treten können. Dies würde dann eine wichtige Rolle spielen, wenn die den „bystander“-Effekt auslösende Substanz nur eine kurze Lebenserwartung hat.

Ein weiterer Nachteil des Co-Kultivierungssystems ist, dass es genauso wie die Microbeam- und die Mediumtransfer-Experimente nur eine *in vitro* Untersuchung von „bystander“-Effekten erlaubt. Verglichen mit der Anzahl von *in vitro* Studien, gibt es nur relativ wenige Untersuchungen über „bystander“-Effekte *in vivo*. Die Existenz von „bystander“-Effekten *in vitro* ist bewiesen und unbestreitbar (Mothersill und Seymour 2001; Prise, Belyakov et al. 2002; Hall and Hei 2003; Mothersill und Seymour 2003; Prise, Folkard et al. 2003; Prise, Folkard et al. 2003) und die Studien von Brooks *et al.* sprechen dafür, dass auch *in vivo* „bystander“-Effekte in nicht bestrahltem Gewebe existieren. Brooks konnte zeigen, dass nach der Injektion von Plutonium in die Leber von chinesischen Hamstern alle Zellen das gleiche Risiko bezüglich chromosomaler Aberrationen tragen, auch wenn nur ein kleiner Teil der gesamten Leber der Bestrahlung ausgesetzt war (Brooks, Retherford et al. 1974; Brooks, Benjamin et al. 1983).

4.3.2 Untersuchung der Endpunkte p53 und G₂-Arrest in bestrahlten und unbestrahlten „bystander“ Zellen nach erfolgter Co-Kultur

Die Entwicklung des in 4.3.1 beschriebenen Co-Kultur Systems war ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Durch den Einsatz dieser neuen Verfahrenstechnik, ist es möglich, bestrahlte und unbestrahlte Zellen miteinander im selben Kompartiment zu kultivieren und anschließend durch fluoreszenz-aktiviertes Zellsorting wieder voneinander zu trennen. Danach kann eine separate Untersuchung sowohl der direkt bestrahlten Zellen, als auch der unbestrahlten „bystander“ Zellen erfolgen. Das Co-Kultur System unterliegt nicht wie die Microbeam- und die Mediumtransfer-Experimente den in 4.3.1 beschriebenen Limitationen. Durch diesen

Versuchsaufbau eröffnen sich neue Wege zur Untersuchung von „bystander“-Effekten mit einer großen experimentellen Flexibilität.

Es gibt verschiedene Mechanismen, durch die „bystander“-Effekte ausgelöst werden können und zur Untersuchung eines jeden Mechanismus gehört ein anderer Endpunkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Endpunkte die Phosphorylierung von p53 und der G₂-Block sowohl in den direkt bestrahlten, als auch in den unbestrahlten „bystander“ Zellen nach erfolgter Co-Kultur untersucht. Diese beiden Endpunkte wurden bereits in der Einleitung eingehend beschrieben (vgl. 1.7 und 1.8).

Um die Rolle der interzellulären Kommunikation über gap junctions bei der Entwicklung von „bystander“-Effekten näher untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit, neben kommunikationsfähigen Zelllinien wie z.B. den b-End oder den A1-5 Zellen, auch kommunikationsdefiziente Zelllinien wie z.B. die Jeg3 oder die T98G Zellen eingesetzt. Mit Hilfe der kommunikationsdefizienten Zelllinien kann die Entwicklung des „bystander“-Effektes ohne die Beteiligung der gap junction vermittelten interzellulären Kommunikation untersucht werden. Zusätzlich zu den kommunikationsdefizienten Jeg3 Zellen wurde ein biologisches System verwendet, das es ermöglicht, durch die Zugabe eines Antibiotikums „bystander“-Effekte entweder mit oder ohne Beteiligung der interzellulären Kommunikation zu untersuchen. Dieses System besteht aus dem Klon Cx43/102 aus der Zelllinie Jeg3. Bei diesem Klon handelt es sich um einen Connexin Transfektanten (Cx43 and Cx26) unter der Kontrolle eines tet-on Systems. Wenn dieser Klon mit Doxyzyklin behandelt wird, ist er in der Lage, mit Hilfe der transfizierten Connexine gap junctions auszubilden und somit zu kommunizieren. Ohne die Zugabe von Doxyzyklin fehlen die nötigen Connexine zur Ausbildung von gap junctions und damit auch die Fähigkeit zur Kommunikation (Gellhaus, Dong et al. 2004).

Der mittels FACS-Analyse ermittelte Kopplungsgrad (vgl. 4.2) der kommunikationsfähigen Zelllinien lag zwischen 86% (AG1522 Zellen) und 98% (A1-5 Zellen). Der mit Doxyzyklin induzierbare Klon Cx43/102 hatte eine Kopplungseffizienz von 74%. Durch die Kopplungsanalysen wurde sichergestellt, dass die Zellen tatsächlich in der Lage sind, über gap junctions miteinander zu kommunizieren. Im Anschluß wurden die Zelllinien mit Hilfe der Co-Kulturtechnik untersucht. In keiner der untersuchten kommunikationsfähigen Zelllinien konnte nach Bestrahlung mit niedrig LET eine Induktion von phosphoryliertem p53 in den „bystander“ Zellen nach Co-Kultur mit bestrahlten Zellen gezeigt werden. Nur die direkt bestrahlten Zellen zeigten eine Phosphorylierung von p53. Das Maximum der Phosphorylierung war bereits 1h nach der

Bestrahlung in allen Zelllinien erreicht. In der Literatur gibt es zahlreiche Studien die belegen, dass „bystander“-Effekte nach Bestrahlung der Zellen mit hoch LET auftreten (Azzam, de Toledo et al. 1998; Prise, Belyakov et al. 1998; Belyakov, Malcolmson et al. 2001). Daher wurde die kommunikationsfähige Zelllinie b-End auch nach Bestrahlung mit Neutronen auf einen „bystander“-Effekt bezüglich der Phosphorylierung von p53 untersucht. Doch auch unter hoch LET Bedingungen konnte in den „bystander“ Zellen, nach erfolgter Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen keine Induktion von phosphoryliertem p53 beobachtet werden. Die bisher im Bezug auf p53 beschriebenen Studien in der Literatur beschreiben jedoch, dass es sowohl nach Bestrahlung mit hoch LET als auch nach Bestrahlung mit niedrig LET zu einer Zunahme von phosphoryliertem p53 in „bystander“ Zellen kommt. Azzam *et al.* konnten mit Hilfe der Western Blot Analyse zeigen, dass die Expression von p53, p21, MDM2, CDC2 und Rad51 in menschlichen Fibroblasten zunimmt, obwohl nur ein kleiner Teil der Zellkerne von einem α -Teilchen durchquert wurde. Durch den Einsatz des gap junction Inhibitors Lindan wird die Expression von p53 und p21 signifikant reduziert (Azzam, de Toledo et al. 1998). Es gibt auch Experimente, in denen es nach Bestrahlung der Zellen mit niedrig LET zu einer Erhöhung von p53 kommt. Dabei wurden menschliche Glioblastoma Zellen in Medium kultiviert, das von Zellen stammt, die zuvor mit geringen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt wurden. Die „bystander“ Zellen zeigen neben einer Zunahme der Proteine p53 und HSP72, auch eine Reduktion der Strahlenempfindlichkeit (Matsumoto, Hayashi et al. 2001).

Auch die Analyse der G₂-Phase nach Bestrahlung der Zellen mit niedrig LET, zeigte keine Hinweise auf einen induzierten G₂-Block in den „bystander“ Zellen nach erfolgter Co-Kultur. Eine Bestrahlung der b-End Zellen mit 3 Gy Neutronen (hoch LET) und anschließende Co-Kultur mit unbestrahlten b-End Zellen hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die G₂-Phase in den unbestrahlten „bystander“ Zellen. Im Gegensatz zur Bestrahlung der b-End Zellen mit Röntgenstrahlen setzt der G₂-Block nach Bestrahlung der Zellen mit Neutronen verzögert ein und dauert länger an. Auch 24h nach der Bestrahlung ist der Anteil der G₂-Phase noch nicht auf den Ausgangswert zurückgekehrt. Dass Zellen nach einer Bestrahlung mit einem verzögerten oder arretierten Proliferationszyklus antworten, ist bekannt (Little 1994; Elledge 1996). Dabei ermöglicht die Arretierung der Zelle in der G₁- bzw. G₂-Phase die Reparatur von DNA-Schäden vor der Replikation des genetischen Materials (Kastan, Zhan et al. 1992; Lane 1992) und der Zellteilung (Nagasawa, Keng et al. 1994). Im Gegensatz zu den Studien über p53 sind die DNA-Schadens-Kontrollpunkte in den „bystander“ Zellen bislang wenig untersucht

worden. Bei der Bestrahlung von diploiden menschlichen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit α -Partikeln mit Dosen kleiner als 1 cGy sowohl zu kurzzeitigen als auch zu langanhaltenden G₁-Blöcken führt. Dies lässt vermuten, dass auch die nicht bestrahlten „bystander“-Zellen zu der zellulären Antwort beitragen. Dagegen ist der G₁-Block nach Bestrahlung mit hohen Dosen in den Fibroblastenzellen mindestens genauso ausgedehnt wie nach Bestrahlung mit niedrig LET (Azzam, de Toledo et al. 2000).

Als Negativkontrolle zu den kommunizierenden Zelllinien wurden die kommunikationsdefizienten Zelllinien untersucht. Um zu gewährleisten, dass zwischen diesen Zellen keine Kommunikation über gap junctions stattfindet wurde zunächst der Kopplungsgrad mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Kopplungseffizienz der kommunikationsdefizienten Zelllinien Jeg3 und T98G lag bei 18%. Diese unspezifische Kopplung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen durch eine geringe Cx-Expression in der Lage sind doch einige gap junction Kanäle zu bilden. Da die FACS-Analyse eine sehr sensitive physiologische Methode ist, kann auch die geringe unspezifische Kopplung der kommunikationsdefizienten Zelllinien noch nachgewiesen werden. Jedoch auch ohne die Beteiligung der gap junctions konnte in den „bystander“-Zellen keine Induktion bezüglich einer Phosphorylierung von p53 oder eines G₂-Blocks beobachtet werden.

Um die Entwicklung von „bystander“-Effekten sowohl mit als auch ohne Beteiligung von gap junctions in ein und demselben biologischen System zu untersuchen, wurde der Klon Cx43/102 aus der Zelllinie Jeg3 verwendet. Bei dem uninduzierten Klon lag die Kopplungseffizienz bei 17%. Die unspezifische Kopplung in Abwesenheit von Dozyzyklin ist mit einer *leakiness* bezüglich der Cx-Expression zu erklären (Gellhaus 2003). Der induzierte Klon hat einen Kopplungsgrad von 74%, und damit ist gewährleistet, dass eine Kommunikation über gap junctions erfolgen kann. Die Untersuchung des Klons Cx43/102 ergab jedoch ebenfalls keine Hinweise auf eine Phosphorylierung des p53 oder einen G₂-Block in den „bystander“-Zellen.

Zwar zeigten die „bystander“-Zellen, die mit den bestrahlten Zellen co-kultiviert wurden, in der Western-Blot Analyse ebenfalls ein p53 Signal (vgl. 3.5.2), dennoch konnte ein „bystander“-Effekt, der durch die Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen ausgelöst wurde, ausgeschlossen werden. Denn auch in den „bystander“-Zellen der unbestrahlten Co-Kultur ist phosphoryliertes p53 detektierbar.

4.4 Vor- und Nachteile der neuen Co-Kulturtechnik

Dass es „bystander“-Effekte gibt, die durch hoch LET oder niedrig LET Bestrahlung hervorgerufen werden können, wurde für viele Zelllinien und viele verschiedene biologische Endpunkte gezeigt. Dass es mit der neuen Co-Kulturtechnik in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen ist, „bystander“-Effekte in nicht bestrahlten Zellen nachzuweisen, kann verschiedene Ursachen haben, die im folgenden diskutiert werden sollen.

Mit Hilfe des Co-Kultursystems wurden auch Zelllinien untersucht, für die „bystander“-Effekte in der Literatur bereits beschrieben worden sind. Dazu gehören z.B. die Haut-Fibroblastenzellen AG 1522. Diese Zelllinie gehört zu den kommunikationsfähigen Zellen und die ermittelte Kopplungseffizienz lag bei 86%. Für diese Zelllinie konnte bereits gezeigt werden, dass nach Bestrahlung der AG 1522 mit niedrig LET die unbestrahlten „bystander“-Zellen eine Erhöhung der Mikronukleusfrequenz, sowie eine Induktion von p21^{WAF1} und eine Zunahme von γ -H₂ AX Foci aufweisen (Yang, Asaad et al. 2005). Darüber hinaus wurde mit der Co-Kulturtechnik die Glioblastoma Zelllinie T98G auf „bystander“-Effekte untersucht. Diese Zelllinie gehört zu den kommunikationsdefizienten Zellen. Experimente mit Microbeam-Bestrahlung haben gezeigt, dass es zu einer signifikanten Zunahme der Mikronukleusanzahl in den unbehandelten „bystander“-T98G Zellen kommt (Shao, Folkard et al. 2004). Da auch für diese beiden Zelllinien keine „bystander“-Effekte nach erfolgter Co-Kultur mit bestrahlten Zellen beobachtet werden konnten, ist eventuell davon auszugehen, dass es mit der verwendeten Technik nicht möglich ist, „bystander“-Effekte in unbestrahlten Zellen zu detektieren. Das könnte unter anderem daran liegen, dass die bestrahlten Zellen trypsiniert werden müssen, um sie in Co-Kultur mit den unbestrahlten Zellen bringen zu können. Die Trypsinierung der Zellen ist bei diesem experimentellen Ansatz unumgänglich. Das liegt zum einen an der Färbung mit DiI. Damit die bestrahlten Zellen von den unbestrahlten Zellen nach der Co-Kultur durch fluoreszenz-aktiviertes Zellsorting wieder getrennt werden können, muss eine der beiden Zellpopulationen vorher markiert werden. Die Markierung erfolgte in dem Co-Kultursystem mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI. Verschiedene Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass es zu einem Farbübertrag der DiI gefärbten Zellen auf die ungefärbten Zellen kommt. Um den Farbübertrag möglichst gering zu halten, müssen die gefärbten Zellen trypsiniert und auf die ungefärbten Zellen gegeben werden (vgl. 3.1.1.6). Dazu kommt, dass die Färbung der bestrahlten Zellen noch zwei weitere Vorteile hat. Auf diese Weise

gewährleistet, dass die „bystander“ Zellen vollständig unberührt sind. Wenn die unbestrahlten Zellen dann einen „bystander“-Effekt zeigen, ist sichergestellt, dass dieser nur durch die Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen ausgelöst worden ist. Dazu kommt, dass der Farbübertrag von den DiI gefärbten Zellen auf die ungefärbten Zellen nicht 100% ig vermieden, sondern nur reduziert werden konnte. Beim Sortieren der Zellpopulation werden die DiI gefärbten Zellen wieder von den ungefärbten „bystander“ Zellen getrennt. Wenn nun ein Farbübertrag von den bestrahlten und DiI gefärbten Zellen auf die „bystander“ Zellen stattgefunden hat, dann wurden diese zu den DiI gefärbten und bestrahlten Zellen sortiert. Das hat auf die Ergebnisse keinen nennenswerten Einfluss. Umgekehrt hätte es bei einer Färbung der „bystander“ Zellen dazu kommen können, dass bestrahlte Zellen den Farbstoff aufnehmen und dann aufgrund des Farbübertrages in die „bystander“ Population sortiert werden. Die Folge wäre, dass direkt bestrahlte Zellen mit unbestrahlten Zellen vermischt werden und die Ergebnisse bezüglich eines „bystander“ – Effektes verfälscht werden würden.

Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Anwendung von Trypsin zu einer Störung der Kulturgefäßoberflächen-Zellmembran-Wechselwirkungen führt, woraus dann resultiert, dass sich die Zellen ablösen lassen. Dies könnte eventuell dazu führen, dass die bestrahlten Zellen nicht mehr in der Lage sind, in den unbestrahlten Zellen „bystander“-Effekte zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass der MAPK-Signalweg, inklusive der c-Jun-NH₂-Terminalkinase, ELK ½ und p38 MAPK, in den „bystander“ Zellen aktiviert ist. All diese Signalwege werden aktiviert durch Signale, die an der Zellmembran entstehen. Daraus folgte die Hypothese, dass die Membran eine wichtige Rolle bei der Induktion von genetischen Veränderungen in den „bystander“ Zellen spielt (Sawant, Randers-Pehrson et al. 2001). Die Bestrahlung von CHO Zellen mit geringen Dosen von α -Partikeln, hat ergeben, dass in Anwesenheit von Filipin die Induktion von SCEs und *HPRT*-Mutationen in „bystander“ Zellen vollständig unterdrückt wird. Bei Bestrahlung der Zellen mit Dosen von 10 cGy, wurde keine unterdrückende Wirkung des Filipin mehr beobachtet. Da Filipin ein Agens ist, welches Lipidverbindungen unterbricht, sprechen auch diese Ergebnisse für eine Beteiligung der Membran bei der Übertragung von „bystander“-Effekten. Dagegen werden die Effekte in den direkt bestrahlten Zellen nicht durch Membransignale induziert (Nagasawa, Cremesti et al. 2002).

Weiterhin wäre zu berücksichtigen, dass nicht alle Zelllinien zu einer „bystander“ Antwort fähig sind. Mothersill *et al.* konnten z.B. keine „bystander“ Antwort in CHOK1 Zellen finden. Daraus lässt sich schließen, dass die CHOK1 Zellen nicht in der Lage sind,

ein „bystander“ Signal zu produzieren bzw. auf ein solches „bystander“ Signal zu reagieren (Mothersill, Seymour et al. 2004). Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass in dieser Arbeit, wie bereits erwähnt, auch Zelllinien (T98G; AG 1522) mit der Co-Kulturtechnik untersucht wurden, für die ein „bystander“-Effekt bereits beschrieben wurde (Shao, Folkard et al. 2004; Yang, Asaad et al. 2005).

Ein weiterer Aspekt, der zu berücksichtigen wäre, ist dass der Mechanismus, der den „bystander“-Effekten zugrunde liegt bislang noch nicht klar ist. Vor allem nicht die Frage, wie bald werden die „bystander“-Effekte nach der Bestrahlung ausgelöst und inwieweit kann das „bystander“ Signals verbreitet werden, sobald es einmal ausgelöst wurde. Um diese Fragen zu klären, wurden AG 1522 Zellen mit α -Partikeln bestrahlt und anschließend wurden die Bildung von γ -H2AX Foci, als Marker für eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, in den direkt bestrahlten und in den „bystander“ Zellen untersucht (Hu, Wu et al. 2006). Um die bestrahlten von den unbestrahlten Zellen in diesem Versuchsaufbau zu trennen, wurde eine speziell entwickelte Platte verwendet. Am Boden der Platte befindet sich ein 3,5 μ m dicker Trägerfilm, auf dem die Zellen angeheftet sind. Die unbestrahlten Zellen werden während des Bestrahlungsvorgangs mit Aluminium abgeschirmt. Eine Zunahme von DNA-Doppelstrangbrüchen in bestrahlten und unbestrahlten Zellen konnte bereits 2 min nach der Bestrahlung beobachtet werden und das Maximum war nach 30 min erreicht. Die durchschnittliche Menge von DNA-Doppelstrangbrüchen, war 30 min nach der Bestrahlung mit 1 cGy in den direkt bestrahlten und in den unbestrahlten „bystander“ Regionen immer noch 2-3 fach höher als in den unbestrahlten Kontrollen. Danach nahm die Anzahl der Doppelstrangbrüche mit zunehmender Inkubationszeit ab und blieb für einen Zeitraum von wenigstens 6h statistisch gesehen immer noch höher als in den Kontrollen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil von Doppelstrangbrüchen nicht von der Bestrahlungsdosis abhängt. Durch den Einsatz der gap junction Inhibitoren Lindan und DMSO konnte der Anteil von DNA-Doppelstrangbrüchen in den „bystander“ Zellen signifikant reduziert werden, was wiederum eine Beteiligung der gap junction vermittelten interzellulären Kommunikation und von ROS an der Entwicklung von „bystander“-Effekten impliziert.

Bislang ist das die einzige Studie, in der die Kinetik des strahleninduzierten „bystander“-Effektes veranschaulicht wird. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse, könnte es durchaus sein, dass das hier eingesetzte Co-Kultursystem außerhalb des Zeitfensters ist, in dem „bystander“-Effekte in nicht bestrahlten Zellen ausgelöst werden. Denn von der Bestrahlung der Zellen bis zur eigentlichen Co-Kultur mit den unbestrahlten

Zellen vergingen im Durchschnitt 30-45 min. Das lag zum einen daran, dass die Bestrahlung selbst eine gewisse Zeit in Anspruch nahm und zum anderen mussten die Zellen nach der Bestrahlung trypsiniert werden. Erst nach erfolgter Zellzahlbestimmung konnten die bestrahlten Zellen im Verhältnis 2:1 auf die „bystander“ Zellen gegeben werden. Da auch verschiedene Zeitpunkte nach der Co-Kultur untersucht wurden, war es nötig entsprechend viele Co-Kulturansätze herzustellen. Außerdem gehörte zu jedem bestrahlten Co-Kultur Ansatz auch eine entsprechende unbestrahlte Kontroll-Co-Kultur. Auch das „Handling“ dieser Ansätze benötigte eine gewisse Zeit. Das könnte bedeuten, dass die bestrahlten Zellen das „bystander“ Signal bereits schon abgegeben haben, bevor sie mit den unbestrahlten Zellen co-kultiviert wurden und ohne dieses Signal wurde in den unbestrahlten Zellen auch kein „bystander“-Effekt ausgelöst.

Ein letzter Punkt, der erwähnt werden sollte, ist, dass die Zellen für die Co-Kulturexperimente mit einer Dosis von 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt wurden. Die Dosis gehört bereits zum hohen Dosisbereich. Zwar gibt es Studien, in denen Zellen, die mit Dosen von 0,1 Gy bis 10 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt wurden „bystander“-Effekte in unbestrahlten Zellen hervorgerufen haben (Yang, Asaad et al. 2005), aber in den meisten Studien wurden die Zellen mit weitaus geringeren Dosen als 5 Gy bestrahlt. Denn „bystander“ Schäden werden gerade bei sehr niedrigen Dosen, bis in den mGy Bereich hinein, beobachtet. Für die meisten untersuchten Endpunkte konnte gezeigt werden, dass der „bystander“ Schaden nicht signifikant zunimmt mit steigenden Bestrahlungsdosen (Ballarini, Biaggi et al. 2002). In menschlichen Keratinocyten wurde bei Bestrahlung mit Gammastrahlen bereits bei Dosen von 0,01-0,5 Gy eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens in den „bystander“ Zellen beobachtet (Seymour und Mothersill 2000). Es gibt auch zahlreiche Studien, die belegen, dass „bystander“-Effekte auch nach der Bestrahlung mit geringen Dichten von α -Partikeln ausgelöst werden. Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass jeder α -Partikel, der einen Zellkern durchquert, eine Dosis von 0,1-0,2 Gy auf den Kern überträgt (Little 2003). In einer Studie mit α -Partikeln, konnte gezeigt werden, dass für die induzierte onkogene Transformation, nur „bystander“-Effekte bei Dosen kleiner als 0,2 Gy wichtig sind (Brenner, Little et al. 2001). Andere Autoren diskutieren, dass auch bei Bestrahlung mit niedrig LET, die „bystander“ Antwort bei Dosen $< 0,2$ Gy vorherrscht (Prise, Folkard et al. 2003). Da für „bystander“-Effekte nachgewiesen wurde, dass sie bei niedrigen Dosen dominierend und bei hohen Dosen gesättigt sind (Prise, Folkard et al. 2003; Smith, Nagar et al. 2003), ist die gewählte Dosis von 5 Gy Röntgenstrahlen eventuell zu hoch, um „bystander“-Effekte zu detektieren.

4.5 Die Untersuchung von „bystander“-Effekten mit Hilfe des „transwell insert coculture system“

Für keine der untersuchten Zelllinien, konnte mit der in 4.3.1 beschriebenen Co-Kulturtechnik ein „bystander“-Effekt in den unbestrahlten Zellen beobachtet werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres System zur Untersuchung von „bystander“-Effekten eingesetzt. Bei diesem sogenannten „transwell insert coculture system“ (Becton Dickinson; vgl. 3.6) handelt es sich um ein Membransystem, bei dem bestrahlte und unbestrahlte Zellen durch eine permeable Membran voneinander getrennt werden. Für die Experimente wird ein Teil der Zellen auf den Multiwell Platten ausplattiert, während der andere Teil der Zellen auf den Membraneinsätzen wächst. Die Co-Kultivierung der Zellen erfolgt nach der Bestrahlung, indem die Membraneinsätze mit den unbestrahlten „bystander“ Zellen einfach in die Multiwell Platten gesetzt werden. Dieses System hat einige Vorteile. Zum einen ist es nicht nötig, eine der beiden Zellpopulationen zu färben oder zu trypsinieren. So bleiben die Zellen, bis auf die Bestrahlung, in diesem System völlig ungestört. Verglichen mit der in 4.3.1 beschriebenen Co-Kulturtechnik ist der Zeitaufwand für die Co-Kultur sehr gering. Denn die „bystander“ Zellen befinden sich bereits auf den Membraneinsätzen müssen für die Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen nur in die Multiwell Platten eingesetzt werden. Auch die Trennung der Zellen nach erfolgter Co-Kultur ist einfach und schnell, denn die Membraneinsätze werden nur aus den Multiwell Platten entfernt. Jedoch hat das Membransystem auch einen Nachteil. Mit der in 4.3.1 beschriebenen Co-Kulturtechnik ist eine Untersuchung von „bystander“-Effekten sowohl mit, als auch ohne die Beteiligung der gap junction vermittelten interzellulären Kommunikation möglich. Da die Zellen beim „transwell insert coculture system“ räumlich voneinander getrennt sind, können sie nicht über gap junctions kommunizieren. So können mit diesem Membransystem nur Medium-vermittelte „bystander“-Effekte untersucht werden.

Es konnte bereits mit Hilfe des „transwell insert coculture system“ gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in unbestrahlten AGO 1522 Zellen Medium-vermittelte „bystander“-Effekte induziert werden (Yang, Asaad et al. 2005). Dazu wurden die AG 1522 Zellen auf den Multiwell Platten mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte die Co-Kultur mit den unbestrahlten „bystander“ AG 1522 Zellen durch Einsatz der Membraninserts. Die „bystander“ Zellen zeigten nach der Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen eine Erhöhung in der Mikronukleusfrequenz, eine Induktion von p21^{Waf1} und eine Induktion von γ -H₂AX

Foci. Darüber hinaus wurde eine Zunahme der ROS (reactive oxygen species) in den „bystander“ Zellen festgestellt. In einer weiterführenden Studie dieser Gruppe wurden „bystander“-Effekte mit dem „transwell insert coculture system“ in den AG 1522 Zellen nach Bestrahlung mit schweren Fe-Ionen untersucht (Yang, Anzenberg et al. 2006). Auch nach Bestrahlung mit Fe-Ionen kommt es zu einer Erhöhung der Mikronukleusfrequenz in den „bystander“ Zellen. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die „Cloning Efficiency“ nach der Bestrahlung mit Fe-Ionen in den „bystander“ Zellen um 20% reduziert ist. Das konnte auch nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen gezeigt werden. Aber im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung konnte nach Bestrahlung mit schweren Fe-Ionen keine Induktion von p21 in den „bystander“ Zellen gezeigt werden.

Im Folgenden werden die mit dem „transwell insert coculture system“ in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ausführlich diskutiert.

4.5.1 Ergebnisse der Analyse von Mikronuklei in „bystander“ b-End Zellen nach erfolgter Co-Kultur mit bestrahlten b-End Zellen

Unter Verwendung des „transwell insert coculture system“ sollte untersucht werden, ob unbestrahlte b-End Zellen einen „bystander“-Effekt zeigen, nachdem sie mit bestrahlten b-End Zellen co-kultiviert wurden. In Anlehnung an die in Kapitel 4.5 erwähnte Arbeit von Yang *et al.* wurde mit diesem System als Endpunkt die Mikronukleus-Bildung in den „bystander“ Zellen untersucht. Mikronuklei stellen ein biologisches Indikatorsystem dar, mit dessen Hilfe auf zytogenetischer Ebene die schädigenden Effekte von ionisierender Strahlung untersucht werden können. Dass es sowohl nach Bestrahlung mit niedrig LET als auch nach Bestrahlung mit hoch LET zu einer erhöhten Mikronukleusfrequenz in den „bystander“ Zellen kommt, wurde schon in verschiedenen Studien beschrieben (Prise, Belyakov et al. 1998; Azzam, de Toledo et al. 2002; Belyakov, Folkard et al. 2002).

Zunächst einmal wurde die Mikronuklei Frequenz nach Bestrahlung mit 1 Gy und 5 Gy Röntgen in den b-End Zellen ohne Co-Kultur mit anderen b-End Zellen bestimmt. Dabei wurde in den b-End Zellen eine dosisabhängige Mikronukleushäufigkeit beobachtet. Die unbestrahlten b-End Zellen zeigten eine auffällig hohe spontane Induktion von Mikronuklei. Die spontane Mikronukleusinduktion lag bei den unbestrahlten b-End Zellen zwischen 51 und 130 Mikronuklei in 1000 zweikernigen Zellen. Das ist sehr hoch, verglichen mit der spontanen Mikronukleusfrequenz von 10-30 Mikronuklei pro 1000 zweikernigen Zellen in unbehandelten Lymphozyten (Müller and Streffer 1994).

Die „bystander“ Zellen zeigten nach Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen eine genauso hohe Mikronukleusfrequenz, wie die Kontrollzellen ohne Co-Kultur. Somit konnte Erhöhung der Mikronukleusfrequenz, die durch die Co-Kultur mit den bestrahlten Zellen ausgelöst wird, mit diesem Membransystem nicht gezeigt werden. Genauer gesagt: für die b-End Zellen konnte kein Medium-vermittelter „bystander“-Effekte beobachtet werden. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die b-End Zellen vielleicht nicht dazu in der Lage sind, ein „bystander“ Signal zu produzieren bzw. auf ein solches „bystander“ Signal zu reagieren. Darüber hinaus gilt wie schon in 4.4 erwähnt, dass „bystander“-Effekte bei hohen Bestrahlungsdosen gesättigt sind. Es ist daher nicht auszuschließen, dass mit einer Dosis von 5 Gy Röntgenstrahlen keine Erhöhung der Mikronukleusfrequenz in den „bystander“ Zellen ausgelöst werden konnte.

5 Zusammenfassung

Seit nunmehr 60 Jahren findet man Effekte, die typisch sind für direkt bestrahlte Zellen auch in nicht direkt bestrahlten Zellen. Diese Situation wird durch den Ausdruck „strahleninduzierter bystander Effekt“ beschrieben. Gemäß dieser Definition sind „bystander“ Zellen nicht direkt von ionisierenden Teilchen oder Wellen getroffen worden, zeigen aber typische Effekte von bestrahlten Zellen. Zu diesen Effekten zählen reduziertes Zellwachstum, Zelltod, Chromosomen-Aberrationen, Mutationen, genomische Instabilität, sowie eine Erhöhung der intrazellulären ROS. Dass „bystander“-Effekte sowohl durch hoch LET als auch durch niedrig LET Bestrahlung hervorgerufen werden können, wurde bereits für viele Zelllinien und viele verschiedene biologische Endpunkte gezeigt. Dennoch ist der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, bislang noch völlig unklar. Ungeklärt ist auch, ob die gap junction vermittelte interzelluläre Kommunikation bei der Entwicklung von „bystander“-Effekten eine Rolle spielt, oder ob die „bystander“-Effekte durch einen löslichen Faktor hervorgerufen werden, der über das Medium vermittelt wird.

Daher war das Hauptziel dieser Arbeit, ein System zu entwickeln, das es ermöglicht, „bystander“-Effekte sowohl mit, als auch ohne die Beteiligung von gap junctions zu untersuchen. In diesem Co-Kultursystem stehen bestrahlte und unbestrahlte Zellen in direktem physikalischen Kontakt miteinander. Nach der Co-Kultur können die beiden Zellpopulationen durch eine Zellsortierung mit dem EPICS[®] Altra[™] wieder voneinander getrennt werden. Durch den Einsatz von kommunikationsfähigen Zelllinien kann mit diesem Co-Kultursystem die Beteiligung der gap junctions an den „bystander“-Effekten untersucht werden. Für die Untersuchung von eventuellen Medium-vermittelten „bystander“-Effekten wird eine kommunikationsdefiziente Zelllinie verwendet. Um zu untersuchen, ob Zellen in der Lage sind, über gap junction zu kommunizieren oder nicht, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Farbstoff-Transfer-Assay in Kombination mit Durchflusszytometrie angewendet.

Doch für all die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien konnte kein „bystander“-Effekte im Bezug auf eine Phosphorylierung von p53 oder einen G₂-Block in den unbestrahlten Zellen gezeigt werden. Dies galt für eine Bestrahlung der Zellen mit niedrig LET wie auch für eine Bestrahlung mit hoch LET.

Darüber hinaus wurde das „transwell insert coculture system“ eingesetzt, um „bystander“-Effekte in unbestrahlten Zellen zu untersuchen. Bei diesem System handelt es sich um ein Membransystem, in dem bestrahlte und unbestrahlte Zellen durch eine

permeable Membran voneinander getrennt werden. Die Zellen werden so zwar im selben Medium inkubiert, aber sie haben keinen physikalischen Kontakt zueinander. In diesem System wurde als Endpunkt in den unbestrahlten Zellen die Mikronukleusfrequenz untersucht. In der untersuchten Zelllinie b-End konnte keine Erhöhung in der Mikronuklei Frequenz nach Co-Kultur mit bestrahlten b-End Zellen beobachtet werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass mit dem „transwell insert coculture system“ bislang nur die b-End Zellen auf „bystander“-Effekte untersucht wurden, und es durchaus sein könnte, dass die b-End Zellen zu den Zellen gehören, die nicht in der Lage sind, ein „bystander“-Signal zu produzieren oder auf ein solches zu reagieren. Deshalb wäre es nötig, in weiteren Experimenten verschiedene Zelllinien mit diesem System auf „bystander“-Effekte zu untersuchen.

Insgesamt sprechen die Befunde dieser Arbeit dafür, dass das hier entwickelte Co-Kultivierungssystem nicht dazu geeignet ist, um „bystander“-Effekte zu untersuchen.

6 Literatur

- Andrade-Rozental, A., Rozental, R., Hopperstad MG, Wu JK, Vrionis FD und D. C. Spray 2000** Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". Brain Res Brain Res Rev. **32**: 308-315.
- Azzam, EL., de Toledo SM., Gooding, T. und J. B. Little 1998** Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. Radiation Research **150**: 497-504.
- Azzam, EL., de Toledo, SM., Waker, AJ. und J. B. Little 2000** High and low fluences of α -particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. Cancer Research **60**: 2623-2631.
- Azzam, EL., de Toledo SM. und J. B. Little 2001** Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from α -particle irradiated to nonirradiated cells. PNAS **98**: 473-478.
- Azzam, EL., de Toledo, SM., Spitz, DR. und J. B. Little 2002** Oxidative Metabolism Modulates Signal Transduction and Micronucleus Formation in Bystander Cells from Particle-irradiated Normal Human Fibroblast Cultures. Cancer Res **62**: 5436-5442.
- Azzam, EL., de Toledo SM. und J. B. Little 2003** Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. Oncogene **22**: 6978-6987.
- Ballarini, F. 2002** Low-dose radiation action: possible implications of bystander effects and adaptive response. Journal of radiological protection **22**: A39-A42.
- Ballarini, F., Biaggi, M., Ottolenghi, A. und O. Sapora 2002** Cellular communication and bystander effects: a critical review for modelling low-dose radiation action. Mutation Research **501** (1-2): 1-12.
- Banaz-Yasar, F., Tischka, R., Iliakis, G., Winterhager, E. und A. Gellhaus 2006** Cell Line Specific Modulation of Connexin43 Expression after Exposure to Ionizing Radiation. Cell Communication and Adhesion, in press.
- Belyakov, OV., Prise, K., Mothersill, C., Folkard, M. und B. D. Michael 2000** Studies of Bystander Effects in Primary Uroepithelial Cells Using a Charged-Particle Microbeam. Radiation Research **153**: 235.

- Belyakov, OV., Malcolmson, A., Folkard, M., Prise, K. und B. D. Michael 2001** Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. Br J Cancer. **84**: 674-679.
- Belyakov, OV., Folkard M., Mothersill, C., Prise, K. und B. D. Michael 2002** Bystander-induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation. Radiat Prot Dosimetry **99**: 249-251.
- Bishayee, A., Rao, DV. und R. W. Howell 1999** Evidence for Pronounced Bystander Effects Caused by Nonuniform Distributions of Radioactivity using a Novel Three-Dimensional Tissues Culture Model. Radiation Research **152**: 88-97.
- Brenner, D., Little, JB. und R. K. Sachs 2001** The Bystander Effect in Radiation Oncogenesis: II. A Quantitative Model. Radiation Research **155**: 402-408.
- Brooks, AL., Benjamin, SA., Hahn, FF., Brownstein, DG., Griffith, WC. und R. O. McClellan 1983** The induction of liver tumors by ^{239}Pu citrate or $^{239}\text{PuO}_2$ particles in the Chinese hamster. Radiation Research **96 (1)**: 135-151.
- Brooks, AL., Retherford, J. und R. O. McClellan 1974** Effect of $^{239}\text{PuO}_2$ particle number and size on the frequency and distribution of chromosome aberrations in the live of the Chinese hamster. Radiation Research **59 (3)**: 693-709.
- Cao, F. L., Eckert, R., Elfgang, C., Nitsche, JM., Synder, SA., Hülser, DF., Willecke, K. und B. J. Nicholson 1998** A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. Journal of Cell Science **111**: 31-43.
- Cheong, N., Zeng, ZC., Wang, Y. und G. Iliakis 2001** Evidence for factors modulating radiation-induced G2-delay: potential application as radioprotectors. Physica Medica XVII.
- Czyz, J., Irmer, U., Schulz, G., Mindermann, A. und D. F. Hülser 2000** Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. Exp. Cell Res. **255**: 40-46.
- Dale, W., 1940** The effect of x-rays on enzymes. Biochem J **34**: 1367-1373.
- Dale, W., 1942** The effect of x-rays on the conjugated protein amino-acid oxidase. Biochem J **36**: 80-85.
- Dale, W., 1943** Effect of x-rays on aqueous solutions of biologically active compounds. Brit J Radiol **16**: 171-172.

- de Toledo, SM., Azzam, EI., Keng, P., Laffrenier, S. und J. B. Little 1998** Regulation by ionizing radiation of *CDC2*, *Cyclin A*, *Cyclin B*, *Thymidine Kinase*, *Topoisomerase II α* , and *RAD51* expression in normal human diploid fibroblasts is dependent on p53/p21^{Waf1}. Cell Growth & Differentiation **9**: 887-896.
- Deshpande, A., Goodwin, EH., Bailey, SM., Marrone, BL. und B. E. Lehnert 1996** Alpha-Particle-Induced Sister Chromatid Exchange in Normal Human Lung Fibroblasts: Evidence for an Extranuclear Target. Radiation Research **145**: 260-267.
- Djordjevic, B., 2000** Bystander effects: a concept in need of clarification. BioEssays **22**: 286-290.
- El-Deiry, WS., 1998** Regulation of p53 downstream genes. Seminars in Cancer Biology **8**: 345-357.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, RA., Hülser, DF. und K. Willecke 1995** Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. Journal of Cell Biology **129**: 805-817.
- Elledge, S.J., 1996** Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. Science **274**: 1664-1672.
- Evans, W. und Martin, P., 2002** Gap junctions: structure and function (Review). Molecular Membrane Biology **19**: 121-136.
- Fei, P. und El-Deiry, WS., 2003** p53 and radiation responses. Oncogene **22**: 5774-5783.
- Fenech, M. und Morley, AA., 1985a.** Solutions of the kinetics problem in the micronucleus assay. Cytobios **43**: 233-246.
- Fenech, M. und Morley, AA., 1985b.** Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research **147**: 29-36.
- Fenech, M. 1993** The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environ Health Perspect **101 Suppl 3**: 101-107.
- Folkard M., Vojnovic B., Prise, KM., Bowey, AG., Locke, R.J., Schettino, G. und B. D. Michael. 1997** A charged-particle microbeam: I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. Int.J.Radiat.Biol. **72**: 375-385.

- Folkard, M., Vojnovic, B., Hollis, KJ., Bowey, AG., Watts, SJ., Schettino, G., Prise, KM. und B. D. Michael 1997** A charged-particle microbeam: II. A single-particle micro-collimation and detection system. Int J Radiat Biol. **72**: 375-385.
- Folkard, M., Schettino, G., Vojnovic, B., Gilchrist, S., Michette, AG., Pfauntsch, SJ., Prise, KM. und B. D. Michael 2001** A Focused Ultrasoft X-Ray Microbeam for Targeting Cells Individually with Submicrometer Accuracy. Radiation Research **156**: 796-804.
- Gellhaus, A., 2003** Einfluß verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3. Dissertation.
- Gellhaus, A., Dong, X., Propson S., Maass K., Klein-Hitpass, L., Kibschull, M., Traub O., Willecke K., Perbal B., Lye SJ. und E. Winterhager 2004** Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in chorioncarcinoma cells. J Biol Chem **279**: 36931-36942.
- Goh, K. und Sumner, H., 1968** Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in the plasma of persons exposed to total-body irradiation? Radiation Research **35**: 171-181.
- Goldberg, Z. und B. E. Lehnert 2002** Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. Int J Oncol. **21**: 337-49.
- Hall, E., 2003** The bystander effect. Health Physics **85**: 31-35.
- Hall, E. und T. K. Hei 2003** Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation. Oncogene **22**: 7034-7042.
- Hei, TK., Wu, LJ., Liu, SX., Vannais, D., Waldren, CA. und G. Randers-Pehrson 1997** Mutagenic effects of a single and an exact number of α particles in mammalian cells. PNAS **94**: 3765-3770.
- Hellmann, P., Winterhager, E. und D. C. Spray 1996** Properties of connexin40 gap junction channels endogenously expressed and exogenously overexpressed in human chorioncarcinoma cell lines. European Journal of Cell Physiology **432**: 501-509.
- Hickman, AW., Jaramillo, RJ., Lechner, JF. und N. F. Johnson 1994** Alpha-particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain. Cancer Res **54**: 5797-5800.
- Hollowell, J. G. und L. G. Littlefield 1968** Chromosome damage induced by plasma of x-rayed patients: an indirect effect of x-ray. Proc Soc Exp Biol Med. **129**: 240-4.

- Hollstein, M., 1994** Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res **22**: 3551-3555.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und C. C. Harris 1991** p53 mutations in human cancers. Science **253**: 49-53.
- Hu, B., Wu, L., Han, W., Zhang, L., Chen, S., Xu, A., Hei, TK. und Z. Yu 2006** The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. Carcinogenesis **27**(2): 245-251.
- Hu, B., Zhou, YX., Wang, X., Zeng, ZC., Iliakis, G. und Y. Wang 2001** The radioresistance to killing of A1-5 cells derives from activation of the Chk1 pathway. The Journal of Biological Chemistry **276**: 17693-17698.
- Hupp, T. R., Meek, DW., Midgley, CA. und D. P. Lane 1992** Regulation of the specific DNA binding function of p53. Cell **71**: 875-886.
- Hussain, SP., 1999** p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. Mutation Research **428**: 23-32.
- Iyer, R. und B. E. Lehnert 2000** Effects of Ionizing Radiation in Targeted and Nontargeted Cells. Archives of Biochemistry and Biophysics **376**: 14-25.
- Iyer, L. und B. E. Lehnert 2002** Alpha-Particle-Induced Increases in the Radioresistance of Normal Human Bystander Cells. Radiation Research **157**: 3-7.
- Iyer, R. und B. E. Lehnert 2000** Factors Underlying the Cell Growth-related Bystander Responses to α Particles. Cancer Research **60**: 1290-1298.
- Kastan, MB., Zhan, Q., El-Deiry, S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, WV., Plunkett, BS., Vogelstein, B. und A. J. Jr. Fornace 1992** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell **71**: 587-597.
- Lane, DP., 1992** p53, guardian of the genome. Nature **358**: 15-16.
- Lehnert, B. und E. H. Goodwin 1997** Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. Cancer Res **57**(11): 2164-2171.
- Little, JB., 1994** Failla Memorial Lecture. Changing views of cellular radiosensitivity. Radiation Research **140**: 299-311.
- Little, JB., 2003.** Genomic instability and bystander effects: a historical perspective. Oncogene **22**: 6978-6987.

- Little, JB., 2006.** Cellular radiation effects and the bystander response. Mutation Research, in press.
- Little, JB., Azzam, EI., Toledo de, SM. und H. Nagasawa 2002** Bystander Effects: Intercellular Transmission of Radiation Damage Signals. Radiation Protection Dosimetry **99**: 159-162.
- Lyng, FM., Seymour, C. und C. Mothersill 2000** Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. British Journal of Cancer **83**: 1223-1230.
- Lyng, FM., Seymour, C. und C. Mothersill 2002** Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability? Radiation Research **157**: 365-370.
- Lyng, FM., Seymour, C. und C. Mothersill. 2001** Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation. Biochemical Society Transactions **29**: 350-353.
- Matsumoto, H., Hayashi, S., Hatashita, M., Ohnishi, K., Shioura, H., Ohtsubo, T., Kitai, R., Onishi, T. und E. Kano 2001** Induction of radioresistance by a nitric oxide mediated bystander effect. Radiation Research **155(3)**: 387-396.
- Malhotra, JD., Domna Karagogeos, PT. und M. Hortsch 1998** Cis-activation of L1-mediated Ankyrin Recruitment by TAG-1 Homophilic Cell Adhesion. J Biol Chem **273**: 33354-33359.
- Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J. und A. J. Levine 1991** Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. Genes & Development **5**: 151-159.
- Michalovitz, D., 1991** p53 mutations: gains or losses. J Cell Biochem **45**: 22-29.
- Moolten, FL., 1986** Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Research **46**: 5276-5280.
- Mothersill, C. und C. Seymour 1997a** Survival of human epithelial cells irradiated with cobalt 60 as microcolonies or single cells. International Journal of Radiation Biology **72**: 597-606.
- Mothersill, C. und C. Seymour 1997b** Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. International Journal Radiation Biology **71**: 421-427.

- Mothersill, C. und C. Seymour 1998a** Mechanisms and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure. Mutagenesis **13**: 421-426.
- Mothersill, C. und C. Seymour 1998b** Cell-Cell Contact during Gamma Irradiation Is Not Required to Induce a Bystander Effect in Normal Human Keratinocytes: Evidence for Release during Irradiation of a Signal Controlling Survival into the Medium. Radiation Research **149**: 256-262.
- Mothersill, C., Stamato, T., Perez, ML., Cummins, R., Mooney, R. und C. Seymour 2000** Involvement of energy metabolism in the production of "bystander effects" by radiation. British Journal of Cancer **82**: 1740-1746.
- Mothersill, C. und C. Seymour 2001** Radiation-Induced Bystander Effects: Past History and Future Directions. Radiation Research **155**: 759-767.
- Mothersill, C., Rea, D., Wright, EG., Lorimore, SA., Murphy, D., Seymour, C. und K. O'Malley 2001** Individual variation in the production of a "bystander signal" following irradiation of primary cultures of normal human urothelium. Carcinogenesis **22**: 1465-1471
- Mothersill, C. und C. Seymour 2003** Radiation induced bystander effects, carcinogenesis and models. Oncogene **22**: 7028 - 7033.
- Mothersill, C. und C. Seymour 2004** Radiation-induced bystander effects-implications for cancer. Nat Rev Cancer **4**: 158 - 164.
- Mothersill, C., Seymour, RJ. und C. Seymour 2004** Bystander Effects in Repair-Deficient Cell Lines. Radiation Research **161**: 256-263.
- Mothersill, C., Stamato, T., Perez, ML., Cummins, R., Mooney, R. und C. B. Seymour 2000** Involvement of energy metabolism in the production of "bystander effects" by radiation. British Journal of Cancer **82**: 1740-1746.
- Müller, W.-U. und C. Streffer 1993** Micronucleus assays. In: Advances in Mutagenesis Research **5**, Edited by G. Obe: 1-108
- Nagar, S., Smith, LE. und W. F. Morgan 2003** Characterization of a Novel Epigenetic Effect of Ionizing Radiation: The Death-Inducing Effect. Cancer Research **63**: 324-328.
- Nagasawa, H. und J. B. Little 1992** Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α - particles. Cancer Research **52**: 6394-6396.

- Nagasawa, H., Keng, P., Harley, R., Dahlberg, W. und J. B. Little 1994** Relationship between γ -ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. International Journal of Radiation Biology **66**: 373-379.
- Nagasawa, H. und J. B. Little 1999** Unexpected Sensitivity to the Induction of Mutations by Very Low doses of Alpha-Particle Radiation: Evidence for a Bystander Effect. Radiation Research **152**: 552-557.
- Nagasawa, H., Cremesti, A., Kolesnik, R., Fuks, Z. und J. B. Little 2002** Involvement of Membrane Signaling in the Bystander Effect in Irradiated Cells. Cancer Research **62**: 2531-2534.
- Nagasawa, H. und J. B. Little 2002** Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. Mutation Research **508**(1 - 2): 121 - 129.
- Narayanan, PK., Goodwin, E. und B. Lehnert. 1997a** Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. Cancer Research **57**: 2164-2171.
- Narayanan, PK., Rudnick, JM., Walthers, EA. und H. A. Crissman. 1997b** Modulation in cell cycle and cyclin B1 expression in irradiated HeLa cells and normal human skin fibroblasts treated with staurosporine and caffeine. Experimental Cell Research **233**: 118-127.
- Narayanan, PK., LaRue, K., Goodwin, EH. und B. E. Lehnert 1999** Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. Radiation Research **152**: 547-63.
- Parsons, H. und JS. Lewis 1954** Subtotal resection of the temporal bone for cancer of the ear. Cancer **7**: 995-1001.
- Prise, KM., Belyakov, OV., Folkard, M. und B. D. Michael 1998** Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. International Journal of Radiation Biology **74**: 793-798.
- Prise, KM., Belyakov, OV., Malcolmson, AM., Ozols, A., Folkard, M. und B. D. Michael 2000** Understanding bystander responses in cellular systems: studies using a charged-particle microbeam. Radiation. Research **153**: 233.
- Prise, KM., Belyakov, OV., Newman, HC., Patel, S., Schettino, G., Folkard, M. und B. D. Michael 2002** Non-targeted effects of radiation: bystander responses in cell and tissue models. Radiat Prot Dosimetry **99**(1-4): 223-226.

- Prise, KM., Folkard, M. und B. D. Michael 2003** Bystander responses induced by low LET radiation. Oncogene **22**: 7043-7049.
- Prise, KM., Folkard, M. und B. D. Michael 2003** A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. Radiat Prot Dosimetry **104**: 347-355.
- Randers-Pehrson, G., Geard, C., Johnson, G., Elliston, CD. und DJ. Brenner 2001** The Columbia University single-ion microbeam. Radiation Research **156**: 210-214.
- Safranyos, RG., Caveney, S., Miller, JG. und N. O. Petersen 1987** Relative roles of gap junction channels and cytoplasm in cell-to-cell diffusion of fluorescent tracers. PNAS **84**: 2272-2276.
- Sawant, SG., Randers-Pehrson, G., Geard, CR., Brenner, DJ. und E. J. Hall 2001** The Bystander Effect in Radiation Oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 Cells In Vitro can be Initiated in the Unirradiated Neighbors of Irradiated Cells. Radiation Research **155**: 397-401.
- Sawant, SG., Zheng , W., Hopkins, KM., Randers-Pehrson, G., Lieberman, HB. und E. J. Hall 2002** The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. Radiation Research **157**: 361-364.
- Scott, D. 1969** The effect of irradiated plasma on normal human chromosomes and its relevance to the long - lived lymphocyte hypothesis. Cell Tissue Kinetics **2**: 295-305.
- Seymour, C. und C. Mothersill 2000** Relative Contribution by Bystander and Targeted Cell Killing to the Low-Dose Region of the Radiation Dose-Response Curve. Radiation Research **153**: 508-511.
- Shao, C., Folkard, M., Michael, BD. und K. M. Prise 2004** Bystander signaling between glioma cells and fibroblasts targeted with counted particles. International Journal of Cancer **116**: 45-51.
- Shao, C., Folkard, M., Micheal, BD. und K. M. Prise 2004.** Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **101**: 13495-13500.
- Simon, A. M. und D. A. Goodenough 1998** Diverse function of vertebrate gap junctions. Cell Biology **8**: 477-483.
- Smith, L., Nagar, S., Kim, GJ. und W. F. Morgan 2003** Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. Health Physics **85**(1): 23-29.
- Sohl, G. und K. Willecke 2003** An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. Cell Commun Adhes **10**: 173-180.

- Souto, J. 1962** Tumour development in the rat induced by blood of irradiated animals. Nature **195**: 1317-8.
- Tomasetto, C., Neveu, MJ., Daley, J., Horan, PK., und R. Sager 1993** Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. J Cell Biol **122**: 157-167.
- Weston SA. and C. Parish 1990** New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. J Immunol Methods **133** (1): 87-97.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. und G. Söhl 2002** Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. Biological Chemistry **383**: 725-737.
- Wu, L.-J., Randers-Pehrson, G., Xu, A., Waldren, CA., Geard, CR., Yu, Z. und T. K. Hei 1999** Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. PNAS **96**: 4959-4964.
- Yang, H., Asaad, N. und K. Held 2005** Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. Oncogene: 1-8.
- Yang, H., Anzenberg, V. und K. D. Held 2006** Effects of iron ions on directly irradiated and bystander normal human fibroblasts in press.
- Zhou, H., Randers-Pehrson, G., Waldren, CA., Vannais, D., Hall, EJ. und T. K. Hei 2000** Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. PNAS **97**: 2099-2104.
- Zhou, H., Suzuki, M., Randers-Pehrson, G., Vannais, D., Chen, G., Trosko, JE., Waldren, CA. und T. K. Hei 2001** Radiation risk to low fluences of α particles may be greater than we thought. PNAS **98**: 14410-14415.
- Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, TH. und R. Civitelli 1998** Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. J. Bone Miner. Res. **13**: 218-228.
- Zirkle, R 1953** Irradiation of parts of individual cells. Science **117**: 487-493.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Iliakis, Institut für medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinikum Essen für die Bereitstellung des Themas und für seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit bedanken.

Für die Hilfe bei allen alltäglichen Problemen und für viele hilfreiche Diskussionen möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. W.-U. Müller bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Dr. Wilfried Böcker bedanken. Nicht nur für die Sortierung der Zellen, sondern auch für die zahlreichen aufmunternden Gespräche und seine motivierenden Denkanstöße.

Bei Herrn Dr. Peter Tamulevicius möchte ich mich für den Intensivkurs „Englisch for runaways“ bedanken und für die zahlreichen lustigen Momente im Labor.

Dr. Frank Windhofer danke ich für eine sehr gute Zusammenarbeit während dieser Zeit mit vielen nützlichen Tips bezüglich der Laborarbeit, für viele nette und lustige Stunden im Labor. Sowie für die seelische Hilfestellung bei manchen „Krisen“.

Frau Tamara Mussfeldt danke ich für die Einweisung in die Zellkultur und die Unterstützung bei den FACS-Analysen. Sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft bei großen und kleinen Problemen.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Strahlenbiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die jederzeit gewährte Hilfestellung bei Laborfragen.

Meiner „Leidensgenossin“ Ferya Banaz- Yasar danke ich für die vielen netten Gespräche.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund und meiner Familie, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die stets aufgebrachte Geduld und liebevolle Unterstützung während der Doktorarbeit hat mir über manchen Tiefpunkt hinweg geholfen.

Lebenslauf

Name: Rabea Tischka

Anschrift: An der Kemnade 4
58456 Witten

Geburtsdatum: 27.07.1974

Geburtsort: Castrop-Rauxel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981-1985 Grundschule in Herne
1985-1991 Realschule in Herne
1991-1994 Gymnasium in Herne

Schulabschluß: 1994 Abitur

Studium: Biologiestudium, Ruhr-Universität Bochum
Thema der Diplomarbeit
„Zur Funktion der APS-Kinase in höheren Pflanzen“

Studienabschluß: 2001 Diplom-Biologin

wiss.Mitarbeiterin 2001-2002 Lehrstuhl für zelluläre Physiologie der Ruhr-Universität Bochum

Doktorarbeit seit 03/2003 Biologie-Doktorandin am Institut für Medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinikum Essen bei Prof. Dr. Georg Iliakis
Thema der Dissertation
„Die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Entwicklung von “bystander“-Effekten“

Essen, 28.02.2006

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr.7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Entwicklung von „bystander“-Effekten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Rabea Tischka befürworte.

Prof. Dr. George Iliakis

Essen, 28.02.2006

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr.7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Rabea Tischka

Essen, 28.02.2006

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr.7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Rabea Tischka

Essen, 28.02.2006